

VERGLEICHENDE ENZYMHISTOCHEMISCHE UND
HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN EXPERIMENTELL ERZEUGTEN DARMTUMOREN

ROLF DIETZEL

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor Prof. Dr. W. Thoenes)

Vergleichende enzymhistochemische und histologische
Untersuchungen an experimentell erzeugten Darmtumoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Rolf Dietzel

aus

Enkenbach-Alsenborn

Mainz 1975

Fachbereichsdekan: Professor Dr. R. Wolf
Referent: Professor Dr. A. Schäfer
Korreferent: Professor Dr. J. Löhr
Tag der mündlichen
Prüfung: 24.3.1976

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLEN 1 · RUF 0 6132 / 57 11



1. Einleitung

1.1. Zielsetzung der Untersuchung der Textstruktur 1

1.2. Aufbau und Gliederung des Textes 2

1.3. Bedeutung der Untersuchung für die Textanalyse 3

1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen 4

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Textstruktur und Textanalyse 5

2.2. Textstruktur und Textanalyse 6

3. Methodik

3.1. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 7

3.2. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 8

Meinen Eltern gewidmet

4.1. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 9

4.2. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 10

4.3. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 11

4.4. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 12

4.5. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 13

4.6. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 14

4.7. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 15

4.8. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 16

4.9. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 17

4.10. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 18

4.11. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 19

4.12. Darstellung der methodischen Vorgehensweise 20

5. Ergebnisse 21

6. Schlussfolgerungen 22

7. Literaturverzeichnis 23

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung

- I. Experimentelle Erzeugung von Darmtumoren 1
- II. Bedeutung und Wirkung des Cycasin 2
- III. Erzeugung von Darmtumoren mit N,N'-Dimethylhydrazin 4
- IV. Bisherige Untersuchung zur Funktion der dargestellten Enzyme unter besonderer Berücksichtigung der Darmschleimhaut 8

B. Material und Methode

- I. Versuchstiere und Versuchsaufbau 20
- II. Histochemische Untersuchungsmethoden 21

C. Ergebnisse

- I. Verteilung der induzierten Darmtumoren 33
- II. Makroskopische und mikroskopische Morphologie der präcancerösen Veränderungen:
 - 1. Hyperplastische Polypen und umschriebene Schleimhauthyperplasien 33
 - 2. Adenomatöse Polypen und umschriebene adenomatöse Schleimhautveränderungen 34
- III. Karzinome
 - 1. Makroskopische Morphologie der induzierten Darmkarzinome 35
 - 2. Mikroskopische Morphologie der induzierten Darmkarzinome 37
- IV. Enzymverteilungsmuster im Darm unbehandelter Ratten 40
- V. Enzymhistochemische Befunde an experimentell erzeugten Darmtumoren:
 - 1. Hyperplastische Polypen und umschriebene Schleimhauthyperplasien 46
 - 2. Adenomatöse Polypen und umschriebene adenomatöse Schleimhautveränderungen 46
 - 3. Karzinome:
 - a. Adenokarzinome 52
 - b. Solide Karzinome 58

D. Diskussion 62

E. Zusammenfassung 69

F. Literaturverzeichnis 70

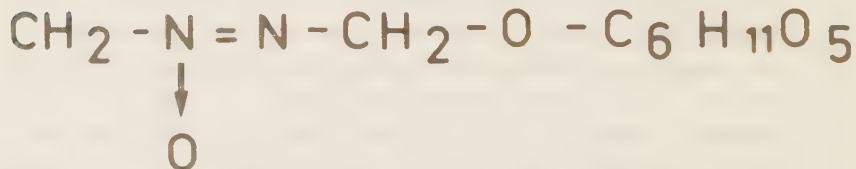
A. Einleitung

I. Experimentelle Erzeugung von Darmtumoren:

Die ersten Versuche, im Tierexperiment Darmtumoren zu erzeugen, sei es mittels Teerbestreichung (SCHABAG, 1927), nach Verabreichung von 20-Methylcholanthren (LORENZ, 1940 und 1947; STEWART, 1947), Bestrahlung des Darmes (RACK, 1955; BERENBLUM, 1956) oder mittels polycyklischer Kohlenwasserstoffe (HORAVA, 1958; MORI, 1955), führten nicht oder nur in Ausnahmefällen zu dem gewünschten Erfolg. Eine der ersten chemischen Tumorinduktionen im Darm gelang WILSON u. Mitarb. (1941) nach oraler Verabreichung von 2-Acetaminofluoren. Weitere cancerogene Stoffe, welche nach oraler Applikation Tumoren des Darmtraktes erzeugen, sind 2,1-Methylchinolin-Methylsulfat (RIBELIN, 1965) und 2,7-bis-(acetylamino)-Fluoren (MORRIS, 1962; STEWARD, 1965; YAMADA, 1971). Auch mit 2,3-dimethyl-4-aminobiphenyl (WALPOLE, 1952; SPJUT, 1971), N-ethyl-N-nitrosourethan und N-methylnitrosourethan (SCHOENTAL, 1965 u. 1968), N-methyl-N-nitrosoharnstoff (SCHREIBER, 1972 a u. b) sowie Äthyl-nitroso-harnstoff (DRUCKREY, 1967 c) konnten Darmtumoren induziert werden. Diese cancerogenen Stoffe wurden entweder intraperitoneal oder subcutan verabreicht. Die injizierten Substanzen wirken als sogenannte resorptive Cancerogene, da diese Stoffe an der Injektionsstelle keine Tumoren induzieren, sondern im Organismus erst zu einer aktiven cancerogenen Substanz metabolisiert werden und dann fern von der Injektionsstelle ihre carcinogene Wirkung entfalten. Man kann diese Substanzen auch als Praecancerogene bezeichnen. Die organspezifische Wirkung einiger dieser Substanzen ist durch den Molekulaufbau bedingt. Die Affinität der resorptiv wirksamen Cancerogene zu bestimmten Organstrukturen kann durch Eingriffe in den Molekulaufbau verändert werden.

II. Bedeutung und Wirkungsweise des Cycasin
(Methyloxymethanol- β -D-Glucosid (Abb.1):

Ein natürlich vorkommendes Cancerogen ist das Cycasin. Cycasin kommt in Pflanzen aus der Gruppe der Cycas-Arten vor, die in tropischen und subtropischen Gebieten der ganzen Welt verbreitet sind. Versuche an Ratten mit Cycasin rufen Tumoren der Leber, der Niere und des Darmes hervor (LAQUEUR, 1965 u. 1967). In hoher Dosierung führt es zur akuten Lebernekrose.



Die chemische Struktur von Cycasin und die weitgehende Ähnlichkeit seiner biologischen Wirkung gleichen derjenigen des Dimethylnitrosamin (MAGEE, 1956). Dimethylnitrosamin induziert allerdings keine Darmtumoren. Darmtumoren konnten jedoch bei oraler Zufuhr des Cycasin erzeugt werden. Intraperitoneal injiziertes Cycasin induziert keine Darmtumoren und wird chemisch unverändert von den Nieren wieder ausgeschieden. Die carcinogenen Eigenschaften des Cycasin treten nur nach Passieren des Intestinaltraktes auf. Dabei wird im Intestinaltrakt durch Einwirkung hydrolytischer Enzyme das Zuckermolekül des Cycasin abgespalten, und es entsteht das Aglukon des Cycasin. Das Aglukon konnte von MATSUMOTO und STRONG (1963) als Methyl-azoxy-methanol indentifiziert werden.

Diese Substanz ist instabil und liefert bei Zerfall Formaldehyd und gasförmigen Stickstoff. Dieses Aglukon ist das eigentliche Cacerogen. Es wirkt cancerogen unabhängig von der Art der Applikation. Die β -Glucosidase, zum größten Teil bakteriellen Ursprungs, wandelt Cycasin in das Aglukon um (KOBAYASHI, 1962). Experimentell konnte dies durch die Untersuchungen von LAQUEUR (1963) und SPATZ (1966) nachgewiesen werden, die cycasinhaltige Nahrung an keimfrei aufgezogene Ratten verfütterten. Bei diesen Tieren konnten keine Darmtumoren erzeugt werden. Das applizierte Cycasin fand sich unverändert im Kot und Urin wieder. Das Aglukon konnte von MATSUMOTO (1965) als stabiler Acetatester synthetisiert werden. Dieser Acetatester ist sowohl die aktive als auch die natürliche Form des Aglukon. Sowohl in vitro wie auch in vivo wirkt das Aglukon als alkylierendes Agens. Die Synthese der Leber-RNA wird unterdrückt, ohne daß die DNA quantitativ beeinflußt wird (WILLIAMS, 1965). Gleichzeitig wird die Neubildung von Proteinen vermindert (SPATZ, 1967a). Ein mutagener Effekt wurde bisher von SMITH (1966) in einem bakteriellen System und von TEAS und DYSON (1967) bei *Drosophila melanogaster* beschrieben.

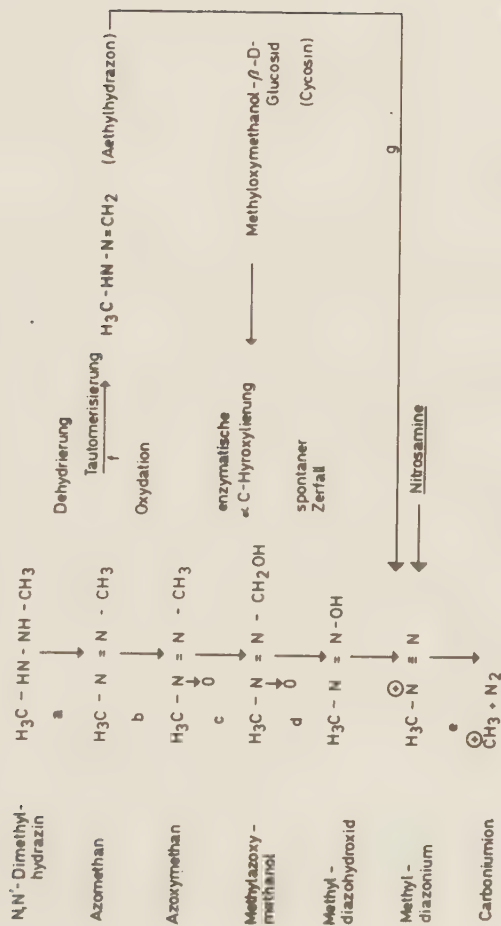
Mit Cycasin lassen sich bei Ratten auch transplazentar Tumoren erzeugen. Diese sind vor allem im Gehirn und Jejunum lokalisiert, wenn man rohes Cycadenmaterial schwangeren Ratten verfüttert (SPATZ, 1967a). Intravenöse Injektion vom Aglukon des Cycasin produziert Mißbildungen in Goldhamsterfoeten (SPATZ, 1967b).

Die carcinogene Eigenschaft des Cycasin und seines Aglukon entwickelt sich nach einer Injektionszeit von etwa 6 Monaten. Die intestinalen Tumoren waren bei Fütterungs-experimenten auf den Dickdarm beschränkt. Nach intraperitonealer Injektion des Cycasin-Aglukon traten auch zahl-reiche Tumoren im Dünndarm auf.

III. Erzeugung von Darmtumoren mit N,N'-Dimethylhydrazin (DMH):

Das von uns verwendete Mittel zur selektiven Tumorerzeugung im Darm ist das N,N'-Dimethylhydrazin (DMH). Die carcinogene darmspezifische Wirkung des DMH tritt nach den verschiedensten Applikationsarten ein (subcutan, intraperitoneal, oral) und ist durch eine hohe Induktionsrate gekennzeichnet (nahezu 100%). Dies bestätigen die Untersuchungen von DRUCKREY u. Mitarb. (1967a), SCHAUER u. Mitarb. (1969 a u. b) an Ratten, von WIEBECKE u. Mitarb. (1969), EVANS u. Mitarb. (1972) an Mäusen und von OSSWALD u. Mitarb. (1968), TOTH (1973) an Goldhamstern. Die Tumoren entstehen sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm, wobei die Zahl der Dickdarmtumoren überwiegt. Die cancerogene Wirkung der symmetrischen Dialkylhydrazine beruht nicht auf einem unmittelbaren Effekt - bei intraperitonealer Injektion treten keine lokalen Karzinome oder Sarkome an der Injektionsstelle auf - sondern auf einer vorhergehenden metabolischen Aktivierung zum alkylierenden Agens im Organismus (DRUCKREY, 1965, 1966 u. 1967a). DMH ist ein resorptives Cancerogen, eine inaktive Transportform, die ihre carcinogene Potenz nahezu selektiv im Darm entfaltet. Richtung und Angriffspunkte der Wirkung hängen weniger von der chemischen Natur der Grundmolekeln ab, als vielmehr von der Art und Position der funktionellen Gruppe. Die Organotropie des DMH beruht auf seinen Alkylgruppen. Sowohl bei oraler als auch bei subcutaner Applikation treten bevorzugt Darmtumoren auf. Weniger häufig Tumoren in der Leber und im Gehörgang. DMH wurde von DRUCKREY (1967a) durch Methylierung von 1,2-Dibenzoylhydrazin und Abspaltung der Alkyl-Reste als Dihydrochlorid hergestellt.

Abbauege des N,N'-Dimethylhydrazin



DMH wirkt nach metabolischem Umbau seines Moleküls indirekt alkylierend (DRUCKREY, 1967b) und wird schon in neutraler Lösung bei Vorhandensein von Schwermetallen leicht zu Azomethan dehydriert (Abb. 2a). Dies ist wahrscheinlich der erste Schritt im Verlauf der Umwandlung des DMH in die aktive Wirkform. Das Azomethan kann wahrscheinlich durch Tautomerisierung in das entsprechende Alkylhydrazon übergehen (Abb. 2f). Alkylhydrazon kann in Alkyldiazonium, die Wirkform der Nitrosamine, umgewandelt werden (Abb. 2g). Daneben existiert ein zweiter Abbauweg: Azomethan kann auch zu Azoxymethan oxydiert werden (Abb. 2b). Azomethan und Azoxymethan wirken stärker cancerogen als DMH. Azoxymethan ist wahrscheinlich die präaktive carcinogene Wirkform. Der weitere biologische Abbau des DMH erfolgt durch oxydative Demethylierung. Dieser Abbauschritt führt zur Abspaltung von Formaldehyd. Die Abspaltung von Formaldehyd wird auf spezielle Demethylasen zurückgeführt, die vorwiegend in den Mikrosomen der Leber vorkommen. Soweit sie als Co-Faktor NADH und Sauerstoff benötigen, besteht ihre wesentliche Funktion in der direkten Einführung einer Hydroxylgruppe in das betreffende Molekül. Es sind also Hydroxylasen (DRUCKREY, 1967b; WITTKOP, 1969; HAWKS, 1971). Demnach verläuft der nächste Abbauschritt, die enzymatische Hydroxylierung an einem α -Kohlenstoffatom (Abb. 2c), ähnlich wie bei den Dialkylnitrosaminen. Es erfolgt die Abspaltung des Alkylrestes und damit die Entwicklung von Diazomethan beziehungsweise von Diazohydroxid (Abb. 2d). Die bakteriellen Demethylasen im Darm scheinen für die Organotropie des DMH nicht ausschlaggebend zu sein, da auch in ausgeschalteten Darmschlingen und in bakterienfreien Organen (Mamma, Leber, Niere) durch DMH Tumoren induziert werden können.

Eine mögliche Erklärung für die organotrope Wirkung des DMH wäre das Vorhandensein von orts- und substratspezifischen Hydroxylasen im Darm. Eine andere Abbaumöglichkeit wäre die α -Hydroxylierung des DMH in der Leber bei gleichzeitiger Kopplung des Abbauproduktes an Glucuronsäure. Dadurch wird das präaktive Produkt genügend stabil, um in entfernte Organe zu gelangen. Hier müßte dann eine enzymatische Spaltung unter Freisetzung der Wirkform stattfinden. Dies könnte dann aber nur in den Organen geschehen, in denen nach einer gewissen Latenzzeit auch Tumoren nachgewiesen werden können (DRUCKREY 1967c). Im weiteren Abbau entsteht aus Azoxymethan das Methylazoxymethanol, eine instabile Substanz. Methylazoxymethanol und sein β -D-Glykosid, das Cycasin, erzeugen ebenfalls Darmtumoren. Da die Wirkung von Azoxymethan weitgehend derjenigen des Cycasin entspricht, beruht die Organotropie des Cycasin nicht nur auf der Spaltung der Glycosidbindung, sondern ist im wesentlichen eine Eigenschaft der Alkylgruppen (DRUCKREY, 1968). Der spontane Zerfall des Methylazoxymethanol führt zu den oben aufgeführten Diazohydroxid, Methyl diazonium und weiter zum Endprodukt Methylkarboniumion. Das Methylkarboniumion ist das eigentliche alkylierend und cancerogen wirkende Agens (DRUCKREY, 1965 a, 1968; WITTIG, 1971). MAGEE und FARBER (1962) haben in vivo mit C^{14} markiertem Dimethylnitrosamin eine Methylierung von intakten Nukleinsäuren nachgewiesen, die bevorzugt am Guaninstickstoff in Position 7 stattfindet und zur Bildung von 7-Methylguanin führt (MAGEE 1962 a u. b). Die Bildung von Methylguanin konnte auch MATSUMOTO u. Mitarb. (1966) mit Methyl-azoxy-methanol in DNS- und RNS-Hydrolysaten nachweisen.

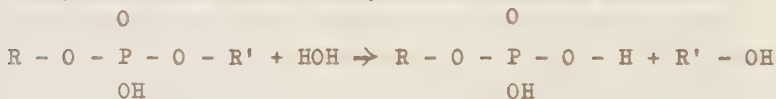
Bei transplazentarer Einwirkung erzeugen DMH und Azoxymethan auch in maximaler Dosierung keine Tumoren bei den Nachkommen. Im Gegensatz dazu können durch Cycasin,

also dem hydroxylierten Azoxymethan, transplacentare Tumoren, hauptsächlich im Gehirn und Jejunum, erzeugt werden. Dies macht deutlich, daß die entscheidende Aktivierung des DMH in der α -Hydroxylierung liegt und daß diese im fetalen Organismus noch nicht ablaufen kann. Im Gegensatz zu DMH (Methylverbindung) sind die entsprechenden Äthylverbindungen auch pränatal stark wirksam. Daraus folgt, daß die enzymatische Aktivierung hochspezifisch sein muß (DRUCKREY, 1968).

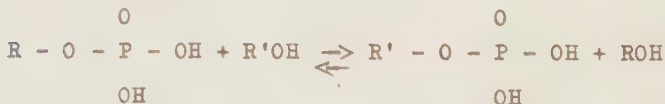
IV. Bisherige Untersuchung zur Funktion der dargestellten Enzyme mit besonderer Berücksichtigung der Darmschleimhaut:

1. Alkalische Phosphatase (a.Ph.; E.C.3.1.3.1, unspezifische, alkalische Phosphomonoesterase).

Phosphomonoesterasen katalysieren folgende Reaktion:



Diskutiert wird die Möglichkeit, daß die a.Ph. in vivo den Transport von einem Alkoholmolekül auf ein anderes Alkoholmolekül katalysiert (DANIELLI, 1958; DIXON und WEBB, 1964).



Die erste Methode für den histochemischen Nachweis, eine Kalzium-Kobalt-Reaktion, entwickelte GOMORI (1939). Diese Methode wurde in den folgenden Jahren vielfach abgewandelt und modifiziert. Wegen der exakten Lokalisation der intrazellulären Aktivität der a.Ph. haben

mittlerweile die verschiedenen "simultanen Azofarbstoffmethoden" (GOESSNER, 1958; BURSTONE, 1962) die Metallsalzmethode weitgehend ersetzt.

Die Hauptaktivität der a.Ph. in der Darmschleimhaut läßt sich im Mikrovillisaum der Zottenepithelien nachweisen. Geringere Aktivitäten finden sich in der lateralen und basalen Zellmembran sowie in den Lysosomen (SHNITKA, 1960; HUGON, 1966 u. 1968; FORSTNER, 1968; HÖHN u. SCHÄFER, 1972). Von den proximalen Darmabschnitten zu den distalen Darmabschnitten hin nimmt die Aktivität der a.Ph. im Epithel der Schleimhaut kontinuierlich ab und ist im unteren Ileum und Colon nicht mehr nachweisbar (DAWSON, 1963; RIECKEN, 1965; HARRISON, 1971). Die Funktion der a.Ph. in der Darmschleimhaut konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Aufgrund ihrer hohen Aktivität im Bürstensaum der Zottenepithelien spielt die a.Ph. sehr wahrscheinlich eine Rolle im transmembranären Transport der Nahrungsbestandteile. Diskutiert wird eine Mitwirkung bei der intestinalen Resorption von Fetten (RIECKEN, 1965; KLEIN, 1967; HUGON, 1968), Proteinen (RIECKEN, 1965; HUGON, 1966), Aminosäuren (Mc. COLL, 1965; SAUNDERS, 1966; HUGON, 1968) und von Glucose (VERZÁR, 1952a u. b).

2. Saure Phosphatase (s.Ph.; E.C.3.1.33, unspezifische, saure Phosphomonoesterase).

Die s.Ph. kann histochemisch mit Bleisalzmethode (GOMORI, 1950) oder mit Farbstoffmethoden (BURSTONE, 1958; BARKA u. ANDERSON, 1962) nachgewiesen werden. Die s.Ph. ist in zahlreichen Organen nachweisbar, in besonders hoher Aktivität in der Prostata, Milz und der Leber. Die s.Ph. umfaßt eine Gruppe von unspezifischen Phosphatasen, die

aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionen gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren differenziert werden können (PEARSE, 1968). Seit den zahlreichen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um de DUVE (1963a u. 1966) gilt die s.Ph. als "lysosomales Leitenzym". Daneben kann die s.Ph. in geringer Aktivität in den Mikrovilli des Dünndarmes und im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (SHNITKA, 1960; JERVIS, 1963; RIECKEN, 1965; IWAI, 1969; SCHÄFER, 1972). Bei Anwendung der Metallsalzmethode nach GOMORI finden sich auch Bleisulfidniederschläge im Bereich der Kernmembran, hierbei handelt es sich möglicherweise um ein Artefakt (LANE und NOVIKOFF, 1965). Andere Autoren konnten hingegen eine spezifische Aktivität an s.Ph. in Zellkernfraktionen nachweisen (HSU und TAPPEL, 1964; ÖCKERMAN, 1965). Die Funktionen der s.Ph., insbesondere diejenigen in der Darmschleimhaut sind im wesentlichen noch ungeklärt. Vermutet wird unter anderem eine Funktion der s.Ph. bei der Resorption von Fetten (BARKA, 1963 u. 1964) und bei der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen, insbesondere von Proteinen durch Pinocytose, ein Vorgang der im Oberflächenepithel von Dünn- und Dickdarm bei neugeborenen Tieren beobachtet werden kann (WILLIAMS und BECK, 1969).

3. Adenosintriphosphatase (ATPase; E.C.3.6.1.3. und E.C.3.6.1.4.)

Die ATPase wird unterteilt in eine durch Kalzium-aktivierbare Myosin-ATPase und in eine durch Magnesium aktivierbare mitochondriale ATPase. In der Enzymnomenklatur der "Enzyme Commission list" werden diese beiden Enzyme als ATP-Phosphohydrolasen bezeichnet. Beide Enzyme katalysieren folgende Reaktion:



Diese Enzyme können mit Metallsalzmethode histochemisch dargestellt werden (WACHSTEIN und MEISEL, 1957; DEIMLING, 1964). In den Oberflächenepithelien des Dünndarms findet sich die Aktivität der ATPase in den Mikrovilli, der Kernmembran und in den Mitochondrien (FORSTNER, 1968; ROSENBERG, 1968). Die Spezifität der histochemischen ATPase-Nachweise wird allerdings dadurch in Frage gestellt, daß auch andere Enzyme wie die Apyrase, Adenylpyrophosphatase und vor allem die unspezifische a.Ph. ATP spalten können (FREIMANN und KAPLAN, 1960). Durch die energiefreisetzende Spaltung des ATP sind die ATPasen wahrscheinlich nicht nur am transmembranösen Kalium- und Natriumtransport beteiligt, sondern indirekt auch an anderen energieabhängigen Transportvorgängen (WINNE, 1968; AMON, 1969). Da die histochemische Verteilung dieses Enzyms in den einzelnen Darmabschnitten derjenigen der a.Ph. gleicht (KLEIN und Mitarb., 1967), ist für die histochemisch nachweisbare Aktivität der ATPase möglicherweise zum Teil die a.Ph. verantwortlich.

4. Glucose-6-Phosphatase (G-6-P; E.C.3.1.3.9.)

Die G-6-P dephosphoryliert Glucose-6-Phosphat. G-6-P konnte bei Säugern in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden. Histochemisch wird die G-6-P mit Metallsalzmethode nachgewiesen (DEIMLING, 1964; WACHSTEIN und MEISEL, 1957). Die Aktivität der G-6-P konnte in Mikrosomefraktionen lokalisiert werden und soll im Jejunum des Meerschweinchens (GINSBERG und HESS, 1960), der Maus (CHICQUOINE, 1965) und des Menschen (WILLIAMS, 1963; OCKERMANN, 1965a) spezifischer Natur sein. Im Bürstensaum des Rattendünndarms hingegen soll das Glucose-6-Phosphat spaltende Enzym Bestandteil der Gruppe der unspezifischen, alkalischen Phosphatasen sein (HERS, 1950; RAGGI, 1960).

Die Funktion der G-6-P in der Darmschleimhaut ist noch nicht vollständig geklärt. Nach LOJDA u. Mitarb. (1970) spielt die G-6-P eine Rolle bei der intestinalen Resorption der Glucose. Diskutiert wird auch eine Funktion bei der intraepithelialen Umwandlung von Fructose in Glucose (ÖCKERMANN, 1965b).

Die Wirkungsweise der G-6-P des Darmes scheint sich von derjenigen in anderen Organen (z.B. in der Leber und Niere) zu unterscheiden. Dafür spricht, daß beim Fehlen der G-6-P beim Typ I der Glykogenspeicherkrankheit in den Darmepithelien keine pathologische Speicherung von Glykogen erfolgt, wie dies für die Epithelien von Leber und Niere charakteristisch ist (ÖCKERMANN, 1965a).

5. 5-Nuclotidase (5-Nuc; E.C.3.1.3.5.)

Die 5-Nuc katalysiert die Hydrolyse von Nucleosid-5-Phosphat unter Abspaltung des Phosphatrestes. Ihre Wirkung ist nicht ganz spezifisch, da sie auch Deoxyl-ribonucleosid-5-phosphat und Ribonucleosid-5-Phosphat angreift. Histochemisch kann dieses Enzym mit Metallsalzmethode nachgewiesen werden (WACHSTEIN u. MEISEL, 1957; DEIMLING, 1964). Da jedoch auch die a.Ph. Adenosinmonophosphat spalten kann, ist die im Bürstensaum des Darmes nachweisbare Aktivität der 5-Nuc möglicherweise nur Bestandteil der Aktivität der unspezifischen a.Ph. (HARDONK, 1968 a u. b).

6. α -Glucosidase (E.C.3.2.1.20)

Die α -Glucosidase spaltet α -glykosidisch gebundene Glucosereste, also sowohl Maltose wie Saccharose. Histochemisch findet sich eine positive Reaktion nur im Duodenum, Jejunum und in der Niere (RUTENBERG u. Mitarb. 1960).

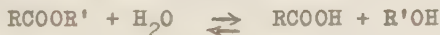
In der Darmschleimhaut ist die α -Glucosidase im Bürstensaum der Zottenepithelien lokalisiert (MILLER und CRANE, 1961). Ihre Funktion steht im Zusammenhang mit der intestinalen Spaltung der Kohlenhydrate und der Resorption der Spaltprodukte (RAPOPORT, 1969).

7. Leucinaminopeptidase (LAP)

NACHLAS u. Mitarb. (1957) konnten mit L-leucyl- β -naphthylamid als Substrat histochemisch eine Naphthylamidase nachweisen, von der sie annahmen, daß es sich um die Leucinaminopeptidase (E.C.3.4.1.1.) handelt. Mittlerweile sind jedoch mehrere Enzyme bekannt, die in der Lage sind, Naphthylamide verschiedener Aminosäuren zu spalten (PATTERSON u. Mitarb. 1963). Enzyme, die neben der LAP Leucin-naphthylamid spalten, sind α -Chymotrypsin, Prolinase, Carboxypeptidase, Cathepsin B u.a. (SYLVÉN und SNELLMANN, 1964 b u. 1968). Im Darm kann Leucin-naphthylamidase (LNAase) in den Mikrovilli des Zottenepithels nachgewiesen werden (FRIC und LOJDA, 1964; PEARSE u. RIECKEN, 1967). LNAase hydrolysiert wahrscheinlich kurzkettige Peptide (CRANE, 1968; LOJDA u. Mitarb., 1970) und besitzt somit eine Funktion bei der Resorption von Aminosäuren.

8. Unspezifische Esterase (uE)

Unter dem Begriff unspezifische Esterase wird eine Gruppe von Enzymen zusammengefaßt, die in der Lage sind, Methylbutyrat oder Naphthylacetat bei einem pH-Optimum zwischen pH 5 und pH 9 zu spalten. Alle diese Enzyme katalysieren folgende Reaktion:



Die uE kann in 3 Untereinheiten gegliedert werden:

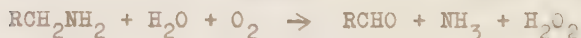
1. A-Esterase (Carboxylesterase, E.C.3.1.1.1.)
2. B-Esterase (Arylesterase, E.C.3.1.1.2.)
3. C-Esterase (Acetylesterase, E.C.3.1.1.7.)

Diese einzelnen Esterase-Typen können auf Grund von Substratspezifitäten, besser jedoch noch durch Anwendung von Aktivatoren und Inhibitoren histochemisch und biochemisch differenziert werden (HOLMES u. MASTERS, 1967). Die Esterase-Hauptgruppen umfassen wiederum zahlreiche Untereinheiten, die z.B. mit elektrophoretischen Methoden aufgetrennt werden können. Die Stoffwechselfunktion der uE ist weitgehend unbekannt (MYERS, 1960). Diskutiert wird eine Funktion im Rahmen des Protein- und Lipidstoffwechsel.

Oxidoreduktasen:

9. Monaminoxidase (MAO; O₂-Oxidoreduktase, E.C.1.4.3.4.)

Es handelt sich um eine Gruppe von Enzymen, die an primären, sekundären und tertiären Monoaminen angreifen:

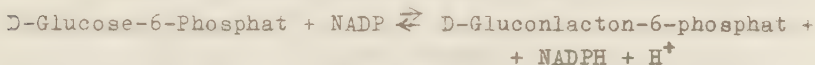


Durch die Oxydation der terminalen Amino-Gruppe werden eine Reihe biogener Amine wie z.B. Serotonin, Tyramin, Athanolamin, Cadaverin, Histamin u.a. inaktiviert. Die MAO besitzt eine Reihe wichtiger Funktionen im Organismus. So zerstört sie z.B. einen Großteil des an Endigungen der adrenogen Nervenfasern freiliegenden Adrenalin. Eine weitere wichtige Aufgabe der MAO ist der Abbau giftiger Amine, die im Darmlumen durch bakterielle Decarboxylierung von Aminosäuren entstehen (EDER, 1957 u. 1958; RIECKEN u. Mitarb., 1965; LOJDA u. Mitarb., 1970).

Nach CLARK (1959) soll die MAO auch bei der Resorption von Proteinen im Darm neugeborener Tiere mitwirken. Histochemisch kann die MAO mit Tryptamin-Hydrochlorid als Substrat nach der Methode von GLENNER u. Mitarb. (1967) nachgewiesen werden.

10. Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD; E.C.1.1.1.49.)

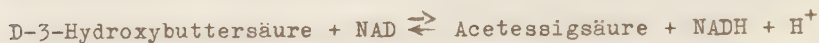
Die G-6-PD katalysiert den ersten Abbauschritt im Pentosephosphatzyklus (bzw. Hexosemonophosphat-Shunt). Glucose-6-Phosphat wird durch Glucose-6-phosphat Dehydrogenase zum Lacton des Gluconsäure-6-phosphat oxydiert:



Endprodukte des Pentosephosphatzyklus sind Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat. Beide Endprodukte können in die Glykolyse eingehen oder erneut dem Pentosephosphatzyklus zugeführt werden. Die Bedeutung des Pentosephosphatzyklus besteht in der Bildung des intermediären Pentosephosphats und des NADPH. NADPH ist wichtig für den Ablauf anderer reduktiv verlaufender Stoffwechselprozesse, wie z.B. die Fettsäuresynthese, die nur in Anwesenheit von NADPH abläuft. Deshalb übernimmt in Organen mit hoher Neucildungsrate von Fettsäuren (Fettgewebe, lactierende Mamma etc.) der Pentosephosphatzyklus einen bedeutenden Anteil des Glucoseabbaues. Im Pentosephosphatzyklus zählt die G-6-PD zu den sog. Schrittmacherenzymen. Die Aktivität der 3-6-PD wird über einen Rückkopplungsmechanismus durch die Intensität der Lipidsynthese kontrolliert. Histochemisch kann die G-6-PD nach der Methode von RUDOLPH und KLEIN (1964) dargestellt werden.

11. β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (HBDh; E.C.1.1.1.30)

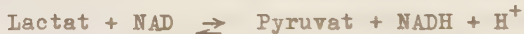
Die HBDh spielt eine wichtige Rolle beim Abbau der Fettsäuren im Rahmen der β -Oxydation. Sie katalysiert die Umwandlung von D-3-Hydroxybuttersäure in Acetessigsäure:



Die HBDh kann auch D-3-Hydroxybutyrat-CoA in Acetoacetyl-CoA oxydieren. Dieses wird durch die Acetyl-CoA-Transacetylase und unter Mitwirkung eines Moleküls CoA in 2 Moleküle Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA kann dann in den Zitronensäure-Zyklus eingeschleußt werden.

12. L-Lactat-Dehydrogenase (LDH; E.C.1.1.1.27)

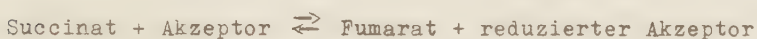
Dieses ubiquitär vorkommende Enzym ist Bestandteil des Glykolytischen Systems und katalysiert folgende Reaktion:



Diese Reaktion ist der letzte Schritt in der anaeroben Glykolyse. Die Aktivität der LDH steht in direkter Beziehung zur Intensität der anaeroben Glykolyse (KARLSON, 1970; MEIER-RUGE, 1970). Unter anaeroben Verhältnissen wird Pyruvat im Säugetierorganismus zu Milchsäure (Lactat) reduziert. Lactat wird insbesondere in der Muskulatur bei mechanischer Arbeit gebildet, wenn die Sauerstoffzufuhr nicht ausreicht, um Pyruvat oxydieren zu können. Der größte Teil des Lactats wird von der Leber aufgenommen z.T. zu CO_2 und H_2O oxydiert z.T. zur Gluconeogenase benutzt.

13. Succinodehydrogenase (SDH; E.C.1.3.99.1.)

Die SDH ist ein Flavoproteid, das mit der Atmungskette eng verbunden ist. Es katalysiert ohne Mithilfe der Nicotinamid-Coenzyme die Umwandlung der Bernsteinsäure in Fumarat, wobei 2 Wasserstoffatome direkt in die Atmungskette eingeschleßt werden. Dieser Wasserstoff kann auch auf unphysiologische Akzeptoren übertragen werden:



Die SDH katalysiert den letzten Schritt des Kohlehydratabbaues und ist ein limitierender Faktor der intrazellulären ATP-Synthese (KARLSON, 1970). Die SDH ist intramitochondrial lokalisiert und kann histochemisch mit der Methode nach NACHLAS u. Mitarb. (1958) nachgewiesen werden.

14. Malatdehydrogenase (MDH; E.C.1.1.1.37 und E.C.1.1.1.40)

Die biologisch wichtige MDH (E.C.1.1.1.37) katalysiert im Zitronensäurezyklus die Umwandlung von L-Malat in Oxalacetat:

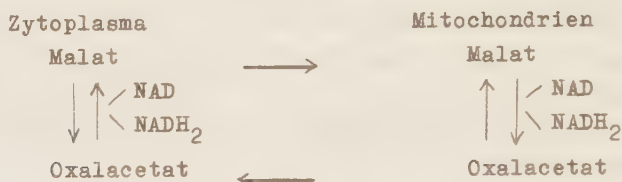


Die andere MDH (E.C.1.1.1.40) katalysiert folgende Reaktion:



Die NAD-abhängige MDH wird unter histochemischen Gesichtspunkten als überwiegend "lösliches Enzym" betrachtet. Die NAD-abhängige MDH ist sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert. Im Zytoplasma entstehendes NADH kann nicht direkt in den Zitronensäurezyklus eingeschleßt werden, da es die Mitochondrienmembran nicht

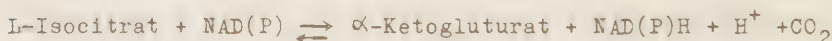
passieren kann. Die Einschleußung des Wasserstoffs kann jedoch über verschiedene reduzierte Substrate indirekt erfolgen (BUDDECKE, 1971):



Das zytoplasmatische NADH kann für die Reduktion von Oxalacetat zu Malat verwendet werden, unter Mitwirkung der zytoplasmatischen Malatdehydrogenase. Histochemisch wird die NAD-abhängige MDH mit der Methode nach SCARPELLI u. Mitarb. (1958) nachgewiesen.

15. Isocitrat-Dehydrogenase (IDH; E.C.1.1.1.41 und E.C.1.1.1.42)

Es existieren 2 Isocitrat-Dehydrogenasen: Eine NAD- und eine NADP-abhängige Dehydrogenase. Diese Enzyme katalysieren im Zitronensäurezyklus folgende Reaktion:

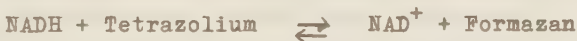


Die NADP-abhängige IDH ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und nur zu 12% an die Mitochondrien gebunden, während die NAD-abhängige IDH ein mitochondriales Enzym ist. Im Gegensatz zur mitochondrialen IDH-Reaktion entsteht bei der zytoplasmatischen Enzymform intermediär gebundenes Oxalsuccinat. Die NAD-abhängige IDH kann mit der Methode nach SCARPELLI u. Mitarb. (1958) nachgewiesen werden.

16. NADH-Diaphorase

Von der Diaphorase nahm man früher an, daß sie für die Redoxkatalyse zwischen NADH und dem Cytochromsystem verantwortlich ist. Mittlerweile stellte sich jedoch heraus, daß die NADH-Diaphorase Bestandteil der α -Ketoglutarat-Oxydase ist. Sie überträgt Wasserstoff von Dihydroliponamid auf NAD^+ und wird deshalb Lipoyl-Dehydrogenase genannt.

α -Ketoglutarat wird im Zitronensäurezyklus decarboxyliert. Dabei wird CO_2 abgespalten und gleichzeitig dehydriert, so daß das um 1 C-Atom kürzere Succinat entsteht. An dieser Decarboxylierung sind Thiaminpyrophosphat und Liponsäure beteiligt. Der Bernsteinsäurerest wird auf CoA übertragen; es entsteht Succinyl-CoA und Dihydroliponsäure, die nun wieder dehydriert werden muß. Dies geschieht durch ein Flavoprotein, die Lipoyl-Dehydrogenase (früher: Diaphorase), die den Wasserstoff auf NAD^+ überträgt. Das entstandene NADH kann über die Atmungskette oxydiert werden (KARLSON, 1970). Der histochemische Nachweis (NACHLAS u. Mitarb., 1958) der NADH-Diaphorase beruht auf folgender Reaktion:



Histochemisch läßt sich die NADH-Diaphorase nahezu ausschließlich in Mitochondrien nachweisen.

B. Material und Methode

I. Versuchstiere und Versuchsaufbau:

Für die Versuche wurden 30 männliche Wistarratten aus der Zucht des Pathologischen Institutes der Universitätsklinik Mainz verwendet. Sie wurden im gleichen Raum geboren und aufgezogen. Die Fütterung bestand aus Altromin R 10 Mischfutter und Wasser ad libitum. Das Gewicht der 4 Monate alten Tiere betrug 200-250 g zu Beginn der Versuche.

Für die Erzeugung der Darmtumoren verwendeten wir N,N'-Dimethylhydraziniumdichlorid (DMH) von der Firma Merck-Schuchardt. Zur Injektion wurde folgende Lösung aseptisch hergestellt: 840mg DMH-Base in 0,01 m Ä.D.T.A. Lösung ad 100 ml (pH 6,5). Wir verabreichten den Wistarratten 21 mg DMH pro kg Körpergewicht einmal wöchentlich (zum gleichen Wochentag und gleicher Uhrzeit) subcutan. Die Injektionen erfolgten über einen Zeitraum von 180 bis 200 Tage. Um das Auftreten der Darmtumoren erfassen zu können, wurden die Versuchstiere regelmäßig gewogen. Bei auffallender Gewichtsabnahme wurden den Versuchstieren in Äthernarkose der gesamte Darm entnommen (Duodenum bis Rektum). Der Darm wurde der Länge nach aufgeschnitten und kurz in 4°C kalter Ringerlösung gespült, anschließend aufgerollt und mit CO₂-Schnee tiefgefroren. Von diesem aufgerollten Darmpräparat wurden im Kryostaten 12 µ dicke Schnitte angefertigt, so daß auf dem Objektträger der gesamte Darm sich als Spirale darstellte und in toto untersucht werden konnte.

Beginn der Versuche stets um 16⁰⁰ Uhr, um circadiane Aktivitätsschwankungen der Darmenzyme ausschließen zu können (SCHÄFER, 1972; ALLBACH, 1972; MIKA, 1972).

II. Histochemische Untersuchungsmethoden:

1. Alkalische Phosphatase (a.Ph.)

Methode nach GÖSSNER (1958)

Vorbehandlung der Schnitte: 12/μ dicke Kryostatschnitte zur Vermeidung von Diffusionsartefakten in absteigender Acetonreihe fixieren, anschließend lufttrocknen bei 4° C in 4% neutralem Formalin 10 Min. fixieren. Spülen in Aqua bidest.

Inkubation: 30 Min. bei 22° C

Inkubationslösung:	Natrium- -Naphtylphosphat	20 mg
	Borax sicca	750 mg
	Natriumhydrogencarbonat	500 mg
	Echtblausalz BB	90 mg
	pH 9,1	1,36 g

Die Trockensubstanz wurde tiefgekühlt aufbewahrt. Bei Bedarf wurde sie in 40 ml Aqua bidest. gelöst, filtriert und entgast.

Nachbehandlung der Schnitte: Nach Inkubation Schnitte in Aqua bidest. spülen. In 10% neutralem Formalin mindestens 20 Min. fixieren. Spülen in Aqua bidest. Eindecken in Glycerin-gelatine.

2. Saure Phosphatase (s.Ph.)

Methode nach GOMORI (1950)

Vorbehandlung der Schnitte: Kleine Gewebsblöcke werden 24 Stunden bei 4°C in 4% neutraler Formalinlösung fixiert (4% Formaldehyd mit

1 % Calciumchlorid, durch weitere Zugabe von Calciumchlorid pH auf 7,0 einstellen). Anschließend spülen in Aqua bidest. Anfertigung von 12/ μ dicken Kryostatschnitten.

Inkubation: 90 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	0,05m Acetatpuffer pH 5,3	40 ml
	3 % Na- β -Glycerophosphat	5 ml
	(Endkonz.: 0,01m)	
	Bleiacetat	0,8g/ 5 ml
		Aquadest
	(Endkonz.: 0,004m)	
	pH 5,3	50 ml

Inkubationslösung zu Versuchsbeginn frisch ansetzen.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 1 Min. in 2%iger Essigsäure bei 22°C. Spülen in Aqua bidest, Farbentwicklung in 1% Ammonsulfid 1-2 Min. Spülen in Aqua bidest. Entwässern in der Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

3. Adenosintriphosphatase (ATPase)

Schwermetall-Simultan-Methode nach von DEIMLING (1964)

Vorbehandlung der Schnitte: 12/ μ dicke Kryostatschnitte 60 Min. in 6,25%igem Glutardialdehyd bei 4°C fixieren. Anschließend in Aqua bidest. spülen.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	0,1 m Bleiacetat	3 ml
	3 m Natriumacetat	5 ml
	0,1m Magnesiumchlorid	1 ml
	1% Tiron	5 ml
	Dinatrium-Adenosintriphosphat	60 mg
	Aqua bidest.	36 ml
	pH 7,2	50 ml

Lösung zu Versuchsbeginn frisch ansetzen. Einstellen des pH mit 1 N NaOH.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. Farbentwicklung in 1% Ammoniumsulfid, 1 Min. Spülen in Aqua bidest. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

4. Glucose-6-Phosphatase (G-6-P)

Methode nach von DEIMLING (1964)

Vorbehandlung der Schnitte: 12/μ dicke Kryostatschnitte 5 Min. in 6,25 %igem Glutardialdehyd bei 4°C fixieren. Spülen in Aqua bidest.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	0,1 m Bleiacetat	3 ml
	0,2 m Triäthanolamin	20 ml
	0,1 m Magnesiumchlorid	1 ml
	0,1 m Acetatpuffer pH 5,0	5 ml
	1 % Tiron	6 ml
	Dinatrium-Glucose-6-Phosphatase	125 mg
	Aqua bidest.	15 ml
	pH 7,0	50 ml

Inkubationslösung wurde zu Versuchsbeginn frisch angesetzt.

Nachbehandlung Spülen in Aqua bidest. Farbentwicklung
der Schnitte: in 1 %igem Ammonsulfid, 1 Min. Spülen
in Aqua bidest. Entwässern in der
Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

5. 5'-Nuclo tidase (Nuc)

Methode nach von DEIMLING (1964)

Vorbehandlung 12/ μ dicke Kryostatschnitte 60 Min.
der Schnitte: in 6,25 %igem Glutardialdehyd bei 4°C
fixieren. Spülen in Aqua bidest.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	0,1 m Bleiacetat	3 ml
	4 m Natriumacetat	5 ml
	1 % Magnesiumchlorid	1 ml
	1 % Tiron	5 ml
	Dinatrium-Adenosinmonophosphat	60 mg
	Aqua bidest.	36 ml
	pH 7,5	50 ml

Lösung wurde zum Versuchsbeginn frisch
angesetzt. PH mit n-NaOH auf pH 7,5
einstellen.

Nachbehandlung Spülen in Aqua bidest. Farbentwicklung
der Schnitte: in 1%igem Ammonsulfid (1 Min.). Ent-
wässern in der Alkoholreihe. Eindecken
mit Eukitt.

6. α -Glucosidase (α -Gluc.)

Methode nach LOJDA (1965)

Vorbehandlung 12/ μ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.
der Schnitte:

Inkubation: 120 Min. bei 37°C

Inkubationslösung: Lösung A:
 6-Brom-2-naphtyl- α -D-Glucopyranosid 6 mg
 auflösen in
 Dimethyl-Formamid 0,75 ml

Lösung B:
 1 Vol. 4% NaNO_2 und
 1 Vol. Hexazotiertes
 Pararosanilin-HCl 0,9 ml

Lösungen A und B in 30 ml 0,1 m
 Phosphatpuffer (pH 6,5) mischen.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. Fixation in
 10 %igem Formalin, 1 Std. Spülen in
 Aqua bidest. Eindecken mit Glycerin-
 Gelatine.

7. Leucinaminopeptidase (LAP)

Methode nach NACHLAS u. Mitarb. (1957)

Vorbehandlung der Schnitte: 12 μ dicke Kryostatschnitte luft-
 trocknen.

Inkubation: 45 Min. bei 37°C

Inkubationslösung: 8 mg/ml Aqua bidest. Leucin-b-
 naphthylamid Hcl 2 ml
 0,1 m Acetatpuffer pH 6,5 20 ml
 0,85 % NaCl 16 ml
 0,02 m KCN 2 ml
 Echtblausalz B 20 mg

pH 6,5 40 ml

Vor Gebrauch filtrieren und entgasen.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 2 Min. in 0,1 m CuSO₄-Lösung. Spülen in Aqua bidest. Fixieren in 10%igem neutralem Formalin. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

8. α-Naphthylesterase (unspezifische Esterase)

Methode nach BARKA und ANDERSON (1962)

Vorbehandlung der Schnitte: 12/μ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen. Fixieren bei 4°C in 10%igem Formalin 10 Min.

Inkubation: 30 Min. bei 22°C

Inkubationslösung:	α-Naphthylacetat	20 mg
	lösen in 0,5 ml Aceton	
	m/15 Phosphatpuffer pH 7,6	40 ml
	Hexazotiertes Fuchsin	4 ml
	(2 ml Pararosanilin-HCL und	
	2 ml 4% NaNO ₂)	
	pH 7,4	44,5 ml

Vor Gebrauch wurde die Inkubationslösung filtriert und entgast.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. Entwässern in der Alkoholreihe. Eindecken mit Eukitt.

9. Monoaminoxydase (MAO)

Methode nach GLENNER u. Mitarb. (1957) modifiziert nach MEIER-RUGE u. Mitarb. (1971)

Vorbehandlung der Schnitte: 12/μ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.

Inkubation: 120 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	Tryptamin-Hydrochlorid	62,5 mg
	0,04 % Natriumsulfat 10 H ₂ O	25 ml
	0,1 % Nitro BT	12 ml
	m/15 Phosphatpuffer pH 7,6	12 ml
	pH 7,6	49 ml

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 1-2 Stunden
fixieren in 10%igem Formalin. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

10. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD)
Methode nach RUDOLPH und KLEIN (1964)

Vorbehandlung der Schnitte: 12 µ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.

Inkubation: 45 Min. bei 22°C

Inkubationslösung:	Di-Natrium-Glucose-6-Phosphat	10 mg
	NADP	12,5 mg
	0,2 m Tris-Puffer pH 7,2	10 ml
	1% Nitro Blue Tetrazolium	5 ml
	Aqua bidest.	10 ml
	pH 7,2	25 ml

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 24 Std. in
4%igem Formalin fixieren. Spülen in Aqua bidest. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

11. β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (HBDh)
Methode nach PEARSE (1972)

Vorbehandlung der Schnitte: 12 µ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung: Lösung A:

Nitro-BT (4 mg/ml)	2,5 ml
0,2 m Tris-Puffer pH 7,4	2,5 ml
5 mM Magnesiumchlorid	1,0 ml
Aqua bidest.	3,0 ml
pH 7,4	9,0 ml

Lösung B:

1,0 m Na-D-3-Hydroxybuttersäure
mit n-HCL auf pH 7,4 einstellen

Diese Lösungen können bei -20°C ge-
lagert werden. Zur Inkubation werden
die Lösungen A u. B gemischt:

0,9 ml Lösung A und

0,1 ml Lösung B

Kurz vor Beginn der Inkubation wird
zur Inkubationslösung noch 0,1 ml
0,1m NaCN und 2 mg NAD pro 1,0 ml In-
kubationslösung gegeben.

Nachbehandlung
der Schnitte:

Spülen in Aqua bidest. 15 Min. in
10%igem Formalin fixieren. In Aqua
bidest. spülen. Eindecken mit Glycerin-
Gelatine.

12. Lactatdehydrogenase (LDH)

Methode nach HESS u. Mitarb. (1958) modifiziert
nach MEIER-RUGE u. Mitarb. (1971).

Vorbehandlung
der Schnitte:

12/10 dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.

Inkubation:

60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	1,0 m Na-DL-Lactat (112 mg/ml)	4 ml
	1,0 m NAD (735 mg/ml)	4 ml
	0,1 m NaCN (mit n-HCL auf pH 7,2 eingestellt)	4 ml
	0,05m Magnesiumchlorid (507 mg/50 ml)	4 ml
	m/15 Phosphatpuffer pH 7,0	10 ml
	0,1 % Nitro-BT	10 ml
	Aqua bidest	4 ml
	Polyvinylpyrrolidon (Mol-Gewicht: ca. 24000)	1,4 g

pH	40 ml
----	-------

Nachbehandlung
der Schnitte: 3 x jeweils 1 Min. in physiologischer
Kochsalzlösung spülen. 10 Min. in
10%igem Formalin fixieren. Eindecken
mit Glycerin-Gelatine.

13. Succinodehydrogenase (SDH)

Methode nach NACHLAS u. Mitarb. (1958) modifiziert
nach MEIER-RUGE u. Mitarb. (1971)

Vorbehandlung 12 μ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.
der Schnitte:

Inkubation: 70 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	m/15 Phosphatpuffer pH 7,6	10 ml
	0,2 m Natriumsuccinat	10 ml
	0,1 % Nitro-BT	20 ml
	pH 7,6	40 ml

Nachbehandlung Spülen in Aqua bidest. 1 Std. fixieren.
der Schnitte: in 10%igem Formalin. Eindecken mit
Glycerin-Gelatine.

14. Malatdehydrogenase (MDH)
Methode nach PEARSE (1972)

Vorbehandlung der Schnitte: 12 μ dicke Kryostatschnitte luft-trocknen.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung: Lösung A:

Nitro-BT (4 mg/ml)	2,5 ml
0,2 m Tris-Puffer pH 7,4	2,5 ml
5 mM Magnesiumchlorid	1,0 ml
Aqua bidest.	3,0 ml
pH 7,4	9,0 ml

Lösung B:

1,0 m Na-L-Malat mit 40% NaOH auf pH 7,4 einstellen.

Lösungen bei -20°C lagern.

Zur Inkubation werden die Lösungen A und B gemischt:

0,9 ml Lösung A und 0,1 ml Lösung B
Kurz vor Beginn der Inkubation pro ml Inkubationslösung 2 mg NAD zugeben.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 15 Min. in 10%igem Formalin fixieren. Spülen in Aqua bidest. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

15. Isocitratdehydrogenase (IDH)
Methode nach PEARSE (1972)

Vorbehandlung der Schnitte: 12 μ dicke Kryostatschnitte luft-trocknen.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung: Lösung A:

Nitro-BT (4 mg/ml)	2,5 ml
0,2 m Tris-Puffer pH 7,4	2,5 ml
5 mM Magnesiumchlorid	1,0 ml
Aqua bidest.	3,0 ml
Polyvinylpyrrolidon	75 mg
pH 7,4	9,0 ml

Lösung B:

1 m Tri-Na-DL-Isocitrat mit N-HCL auf pH 7,4 einstellen.

Diese Lösungen können bei -20°C gelagert werden. Zur Inkubation werden die Lösungen gemischt:

0,9 ml Lösung A und 0,1 ml Lösung B
Kurz vor Beginn der Inkubation wird zur Inkubationslösung noch 0,1 ml 0,1m NaCN und 2 mg NAD pro 1,0 ml Inkubationslösung hinzugegeben.

Nachbehandlung der Schnitte: Spülen in Aqua bidest. 15 Min. in 10%igem Formalin fixieren. In Aqua bidest. spülen. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.

16. NAD-Diaphorase

Methode nach NACHLAS u. Mitarb. (1958)

Vorbehandlung der Schnitte: 8 µ dicke Kryostatschnitte lufttrocknen.

Inkubation: 60 Min. bei 37°C

Inkubationslösung:	0,5 m Natriumlactat	0,6 ml
	1,5 % Lactatdehydrogenase	0,2 ml
	NAD (5 mg/ml)	0,3 ml
	Nitro-BT (5 mg/ml)	0,3 ml
	Aqua bidest.	0,6 ml
	0,06 m Phosphatpuffer pH 7,2	1,0 ml
		pH 7,2 3,0 ml

Die Inkubationslösung wurde auf die
Schnitte getropft.

Nachbehandlung der Schnitte:	Spülen in Aqua Bidest. Fixieren in 10%igem Formalin. Spülen in Aqua bidest. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.
---------------------------------	--

Die Inkubationslösungen der aufgeführten Nachweismethoden, mit Ausnahme der ATPase, G-6-P, 5-Nuc und s.Ph., wurden zu Beginn der Versuchsreihe in größeren Mengen angesetzt, portionsweise in Plastikbehälter abgefüllt und bei -30°C aufbewahrt. Bei Versuchsbeginn wurden die Einzeldosen aufgetaut. So wurde die Zusammensetzung der Inkubationslösungen während der gesamten Versuchsreihe konstant gehalten. Die Lösungen um den Nachweis der ATPase, G-6-P, 5-Nuc und der s.Ph. wurden zu Versuchsbeginn frisch angesetzt.

C. Ergebnisse

I. Verteilung der induzierten Darmtumoren:

Bei sämtlichen Versuchstieren traten nach einem Behandlungszeitraum von 180 - 200 Tagen zumeist multiple Tumoren in Dünn- und Dickdarm auf. Es ist nicht möglich, die genaue Zahl der Tumoren anzugeben, da bei fortgeschrittener Cancerisierung, insbesondere im Dickdarm, die Tumoren zum Teil dicht bei dicht liegen, konfluieren und manchmal größere Darmabschnitte tumorös umwandeln. Bei unseren 30 Versuchstieren fanden sich in den einzelnen Darmabschnitten folgender Tumorbefall: Duodenum (10), Jejunum (3), Ileum (2), Cöcum (1), Colon asc. (6), Colon transv. (6), Colon desc. (3) und Rektum (4). Bei 25 der 30 untersuchten Ratten konnten Metastasen in den Lymphknoten des Bauchraumes festgestellt werden.

II. Makroskopische und mikroskopische Morphologie der präcancerösen Veränderungen

1. Hyperplastische Polypen und umschriebene Schleimhauthyperplasien:

Insgesamt konnten nur 2 isolierte hyperplastische Polypen nachgewiesen werden und zwar im Jejunum und Colon asc. Hingegen findet man in Umgebung von Karzinomen fast regelmäßig Schleimhauthyperplasien. Da die hyperplastischen Polypen sehr klein sind, werden sie erst zufällig in den histochemischen Präparaten entdeckt.

Die Krypten der hyperplastischen Polypen sind im Vergleich zu denjenigen der normalen Mukosa deutlich verlängert, während die Oberflächen- und Kryptenepithelien histologisch eine vollständige Ausdifferenzierung aufweisen. Die Verteilung der Blutgefäße im Stroma ist identisch mit der Gefäßarchitektur der normalen Darmmukosa. Eine entzündliche Stromareaktion findet sich nicht.

2. Adenomatöse Polypen und umschriebene adenomatöse Schleimhautveränderungen

Adenomatöse Polypen (Abb. 3), teils gestielt, teils breitbasig aufsitzend, finden sich in Dünndarm (3) und Dickdarm (3). Die Mehrzahl zeigt eine papilläre Komponente, während hingegen ausschließlich papillär gegliederte, adenomatöse Polypen (sog. villöse Adenome) nicht gefunden wurden. Daneben finden sich insbesondere in der Umgebung adenomatöser Polypen und Karzinome flache, das Niveau der Mukosa nicht oder nur gering überragende, herdförmige adenomatöse Veränderungen der Schleimhaut. Die Drüsenschläuche sind verlängert, verzweigt und dilatiert. Besonders bei größeren Adenomen sind die Epithelzellen stellenweise mehrreihig angeordnet. Hier und da produzieren die Epithelien Schleim. Das Zytoplasma der z.T. elongierten Zylinderepithelien färbt sich basophiler an als die Epithelzellen der normalen Mukosa. Die Zellkerne finden sich überwiegend basal. Herdförmig zeigen sie eine geringe Hyperchromasie. Hauptsächlich im Bereich der mehrreihigen Epithelverbände erkennt man reichlich Mitosen. Im Stroma sieht man, von Tumor zu Tumor in unterschiedlichem Ausmaß, entzündliche Zellinfiltrate, größere und kleinere Blutgefäße, zwischen den Drüsenschläuchen zahlreiche Kapillaren, fibrosierte Gewebsabschnitte und frische sowie ältere Blutungen.

An jeder Stelle der Adenome können herdförmig begrenzte Epithelotypen auftreten. Der nächste Schritt im Ablauf der Cancerisierung ist die Ausbildung von Mikrokarzinomen. Dabei durchbrechen einzelne Epithelzellen die Basalmembran und infiltrieren das subepitheliale Stroma. Bei Aufarbeitung der Adenome in Stufenschnitten kann man häufig im Bereich der Tumorbasis ein invasives Wachstum der Drüsenschläuche

beobachten. Die Fähigkeit zum infiltrativen Wachstum ist von der Tumorgroße unabhängig. Infiltrierendes Wachstum der Drüsen findet sich ebenso bei sehr kleinen wie bei großen adenomatösen Tumoren. Bei einzelnen Adenomen kann man beobachten, daß nur ein einziger Drüsenschlauch die Muscularis mucosae durchbrochen hat und in die Submukosa eindringt. In der Umgebung dieser invasiven Drüsenschläuche bildet sich eine chronisch-entzündliche Reaktion aus. Es erfolgt eine Neubildung von kollagenem Bindegewebe und zahlreichen kapillären Blutgefäßen. Daneben finden sich auch reichlich Makrophagen und einzelne Granulocyten.

III. Karzinome

1. Makroskopische Morphologie der induzierten Darmkarzinome:

Makroskopisch können exophytische und flachwachsende Tumoren unterschieden werden (Abb. 4). Die flachwachsenden Tumoren breiten sich z.T. rasenartig über weite Darmabschnitte aus. Derartige Tumoren finden sich nahezu ausschließlich im Dickdarm. Sie durchsetzen zumeist die gesamte Darmwand, die dann als starres Rohr erscheint, und wachsen kontinuierlich in das subseröse Bindegewebe ein.



Abb. 3: Adenomatöser Polyp des Colon.
Hämatoxylin-Eosin, Vergr.: 13 x

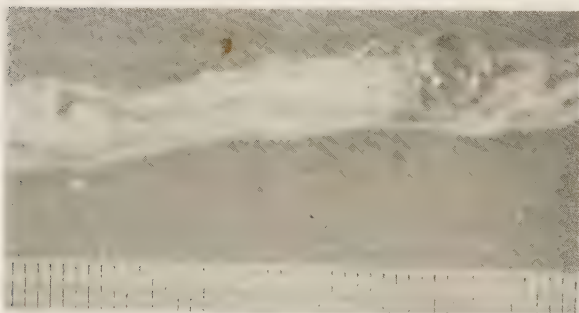


Abb. 4: Ein flachwachsendes und ein
polypöses Karzinom im Colon.

2. Mikroskopische Morphologie der induzierten Darmkarzinome:

Histologisch können die Darmkarzinome in folgende Gruppen eingeteilt werden: Adenokarzinome, Adenokarzinome mit Schleimbildung, solide Karzinome und solide Karzinome mit Schleimbildung. In fast allen Karzinomen finden sich jedoch fließende Übergänge zwischen den einzelnen Differenzierungsformen. In manchen Tumoren können drei Wachstumsarten nachgewiesen werden.

Zahlreiche der von uns untersuchten Adenokarzinome (Abb. 5) entwickeln sich aus adenomatösen Polypen bzw. diffusen, nicht prominenten adenomatösen Veränderungen der Darmschleimhaut. Im letzteren Fall entstehen flachwachsende Adenokarzinome, die sich scharf von der angrenzenden, normalen Mukosa absetzen. Die Adenokarzinome können aufgrund ihres Reifegrades eingeteilt werden in gut differenzierte und wenig differenzierte Adenokarzinome. Zu den am wenigsten differenzierten Formen zählen die soliden Karzinome.

Die gut differenzierten Adenokarzinome zeigen oft nur ein gering ausgeprägtes infiltrierendes Wachstum. Häufig breiten sich diese Tumoren nur innerhalb der Mukosa und Submukosa aus, ohne Durchbruch in das subseröse Bindegewebe. In den Randbezirken werden die Adenokarzinome von proliferierendem Bindegewebe umgeben, in dem sich eine chronisch-entzündliche Reaktion nachweisen läßt. Abschnittsweise werden die Tumoren durch Granulationsgewebe geradezu abgekapselt. Histologisch finden sich in diesen Arealen massenhaft Kapillaren und retikulo-histiocytäre Zellformen, weiterhin Fibroblasten und

Granulocyten. Im granulocytär infiltriertem Stroma zwischen den Drüsenschläuchen finden sich ebenfalls reichlich Kapillaren und Makrophagen.

In den soliden Karzinomen finden sich gruppenförmig beieinanderliegende oder auch einzelne Tumorzellen in einem netzartigen, herdförmig fibrosierten Stroma (Abb. 6). Zwischen den Tumorverbänden liegen reichlich Makrophagen, Granulocyten und abschnittsweise dicht bei dicht zahlreiche kapilläre Blutgefäße. In den meisten soliden Karzinomen finden sich in unterschiedlichem Ausmaß auch Siegelringzellen (Abb. 21a). Die soliden Karzinome weisen ein ausgeprägtes infiltratives Wachstum auf, mit Einbruch in das subseröse Bindegewebe. Über weite Strecken können die soliden Karzinome auch in der Submukosa zwischen völlig erhaltener Mukosa und Muscularis wachsen.

Die von uns erzeugten schleimbildenden Karzinome lassen sich histologisch in zwei Hauptgruppen einteilen: 1. das gut differenzierte, schleimbildende Adenokarzinom und 2. das solide schleimbildende Karzinom. Zwischen beiden Tumorformen gibt es fließende Übergänge und zahlreiche Mischformen. Insgesamt zeigen die schleimbildenden Tumoren ein ausgeprägteres infiltratives Wachstum als nicht-schleimbildende Karzinome mit gleichem Differenzierungsgrad. Die schleimproduzierenden Adeno-Karzinome bilden überwiegend weitlumige z.T. cystisch erweiterte Drüsen, die von einem ungleichmäßig aufgebauten Epithel ausgekleidet werden. Vereinzelt finden sich auch Epithelverbände, die keinen Schleim produzieren. Die undifferenzierten schleimbildenden Karzinome durchsetzen meistens die gesamte Darmwand nach Art einer Linitis plastica. In den z.T.

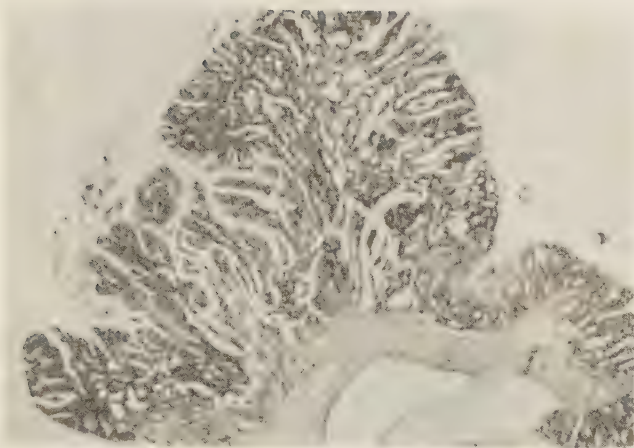


Abb. 5: Polypöses Adenokarzinom im Colon.
Hämatoxylin-Eosin, Vergr.: 13 x

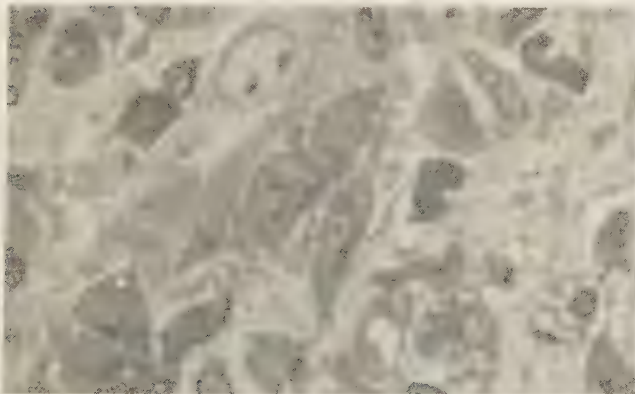


Abb. 6: Solides Karzinom mit beginnender
Ausbildung von Siegelringzellen.
Methylenblau, Vergr.: 1400 x

ausgedehnten verschleimten Arealen finden sich gruppenförmig oder einzeln liegende Siegelringzellen, daneben auch Tumorzellen, die keine Schleimproduktion erkennen lassen. In schmalen in das Tumorgewebe einstrahlenden Bindegewebssepten liegen kapilläre Blutgefäße. Sowohl zwischen differenzierten als auch wenig differenzierten Adenokarzinomen, schleimbildenden Adenokarzinomen, soliden Karzinomen und soliden, schleimbildenden Karzinomen gibt es zahlreiche Übergangsformen und Mischtypen.

IV. Enzymverteilungsmuster im Darm unbehandelter Ratten

Alkalische Phosphatase (a.Ph., Abb. 7 und Abb. 12b):

In den Oberflächenepithelien findet sich eine positive Reaktion in einer breiten supranuklearen Zone entlang der lateralen und basalen Zellmembran. Zumeist ist die supranukleare Zone durch eine schmale Aufhellung noch einmal unterteilt. Dabei entspricht die innere Zone dem Golgi-Feld und die äußere dem Bürstensaum. Von dem proximalen zu dem distalen Dünndarmabschnitt fällt die Aktivität der a.Ph. im Oberflächenepithel deutlich ab, so daß im oberen Ileum nur noch im Bereich des Bürstensaumes eine schwache Reaktion nachweisbar ist. Im unteren Ileum und im Colon ist die Reaktion in den Epithelien negativ. Die Kapillaren der Lamina propria zeigen ein gegenüber dem Oberflächenepithel entgegengesetztes Aktivitätsmuster. Während sich im Ileum im Zottenstroma sowie zwischen den Krypten zahlreiche Kapillaren eine positive Reaktion zeigen, färben sich im Duodenum nur wenige Kapillaren an. Daneben färbt sich die äußere Wandschicht größerer Blutgefäße in der Submukosa positiv an. Weiterhin zeigen einzelne freie Zellen im Stroma eine positive Reaktion. Es dürfte sich hierbei unter anderem um Granulozyten handeln. Eine schwache Aktivität lassen die Muskelzellen der Muscularis propria erkennen.

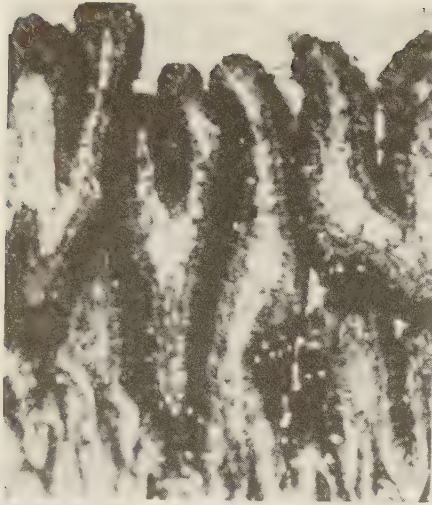


Abb. 7: Histochemische Darstellung der a.Ph.
im Duodenum.
Vergr.: 90 x

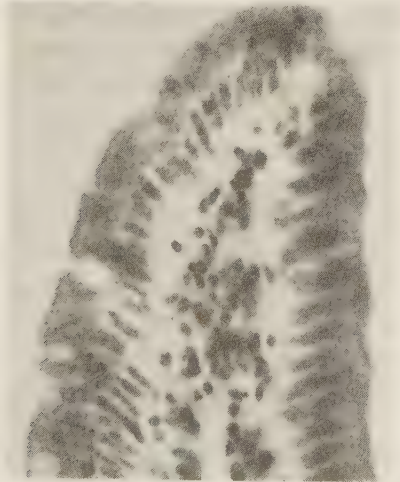


Abb. 8: Histochemische Darstellung der s.Ph. in
einer Zotte des Duodenum.
Vergr.: 560 x

Saure Phosphatase (s.Ph., Abb. 8): Die s.Ph. findet sich im Oberflächenepithel des Dünndarms als granulierter, supranucleär gelegener Aktivitätssaum, der dem Golgi-Feld und den apikalen Lysosomen entspricht. Von proximal nach distal fällt die Aktivität im Oberflächenepithel des Darmes ab. Im unteren Ileum und im Colon lassen sich im Bereich der apikalen Anteile der Epithelzellen nur geringe Aktivitäten nachweisen, es findet sich nur noch eine feingranuläre Reaktion der perinuklearen Lysosomen. In der Lamina propria besitzen einzelne Zellen eine hohe Aktivität, die perinuklear in Form von Granula lokalisiert ist. Diese Zellen entsprechen wahrscheinlich reticulohistio-cytären Zellformen. Daneben zeigen die Ganglienzellen der nervösen Plexus eine hohe Aktivität. Die Aktivität der s.Ph. im Zottenstroma und der Ganglienzellen weist keine regionalen Aktivitätsunterschiede auf. Eine hohe Aktivität findet sich in den Fanethschen Körner-Zellen.

Adenosintriphosphatase (ATPase): Im Duodenum und oberen Jejunum findet sich eine hohe Aktivität im Bereich des Bürstensaumes und im apikalen Cytoplasma. Zwischen Zellkern und dieser Aktivitätszone bleibt ein freier Abschnitt. Die positive Reaktion erstreckt sich von der Zottenspitze bis zur Basis mit einer geringfügigen Aktivitätsabschwächung im unteren Zottendrittel. Eine schwache Aktivität zeigen die Zellkerne der epithelialen Zellen. Von proximal nach distal fällt die ATPase im Bürstensaum steil ab, sie ist im Ileum, Cöcum und Colon ascendens schwach positiv und wird in dem distalen Dickdarmabschnitt völlig negativ. An der Epithelbasis und den lateralen Zellwänden findet sich keine positive Reaktion.

Weiterhin zeigt sich eine starke Aktivität der ATPase in der Media von Arteriolen und Arterien sowie in den Ganglienzellen des Plexus myentericus und submucosus. Regionale Aktivitätsunterschiede finden sich allerdings in dieser Struktur der Darmwand nicht.

Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase): Die Reaktion ist positiv in den Zottenepithelien des Duodenums bis zum unteren Jejunum. Dabei zeigt die G-6-Pase von proximal nach distal ein steiles Aktivitätsgefälle. In den Epithelien findet sich die Hauptaktivität der G-6-Pase im Bereich des Bürstensaumes. Auch entlang der lateralen Zellmembran findet sich eine schwach positive Reaktion. Im Epithel des Ileum und Colon kann die G-6-Pase nicht nachgewiesen werden.

5-Nucleotidase (5-Nuc): Dieses Enzym zeigt im proximalen Dünndarmabschnitt im Bereich des Bürstensaumes eine positive Reaktion. Die laterale Zellmembran stellt sich nicht dar. Ebenso wie bei der G-6-Pase fällt die Aktivität im distalen Dünndarm steil ab und ist im Ileum und Colon völlig negativ.

α-Glucosidase (α-Gluc): Eine positive Reaktion findet sich nur in den apikalen Bezirken der Oberflächenepithelien, wahrscheinlich im Bürstensaum. Von proximal nach distal erfolgt ein Aktivitätsabfall. Im Dickdarm kann keine Aktivität der α-Glucosidase nachgewiesen werden.

Leucinaminopeptidase (LAP): Die LAP zeigt in den Zottenepithelien eine fein-granuläre Reaktion. Im Bereich der apikalen Zellanteile konfluieren die Granula zu einem supranukleär gelegenen und einem unmittelbar apikal gelegenen Aktivitätssaum. Die äußere Zone entspricht dem Mikrovillisaum und die supranukleäre Zone dem Golgi-Feld.

Die Aktivität der LAP steigt vom Duodenum zum unteren Jejunum leicht an, um im weiteren Verlauf des Dünndarms schwächer zu werden. Am Übergang der Dünndarm- zur Dickdarmschleimhaut endet die Aktivität der LAP abrupt. Im gesamten Colonepithel ist die Reaktion negativ.

Unspezifische Esterase (uE, Abb. 9): Die uE läßt sich insbesondere im Zottenepithel des oberen Dünndarmabschnittes in hoher Aktivität nachweisen. Die Kryptenepithelien zeigen eine nur schwach positive Reaktion. Das enzymatische Reaktionsprodukt findet sich in den Oberflächenepithelien als fein granulärer Niederschlag, der apikal zu einem Saum konfluiert. Im Bereich der lateralen und basalen Zellanteile läßt sich eine schwache Aktivität nachweisen. Vom Duodenum zum Ileum und Colon ascendens findet sich in den Zottenepithelien ein kontinuierlicher Aktivitätsabfall. In distalen Dickdarmabschnitten wird die Aktivität im Epithel nahezu negativ. Weiterhin zeigen die Muscularis mucosae und die Ganglienzellen der Darmwand eine geringe Aktivität, die keine regionalen Unterschiede aufweist.

Dehydrogenasen (Abb. 10): Sämtliche untersuchten Dehydrogenasen zeigen bei Anwendung histochemischer Methoden eine weitgehend identische intrazelluläre Lokalisation, so daß sie nicht getrennt besprochen werden müssen. Im Oberflächenepithel ist die Aktivität der Dehydrogenasen etwas stärker ausgeprägt als im Kryptenepithel. In den Epithelzellen konfluieren die enzymatisch gebildeten Formazangranula apikal und unmittelbar über dem oberen Kernpol, so daß in der apikalen Zellhälfte zwei Aktivitätszonen zu sehen sind. Para- und infranukleär finden sich weniger Formazangranula als in den apikalen Zellanteilen, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. Die einzelnen Dehydrogenasen unterscheiden sich bei ihrer

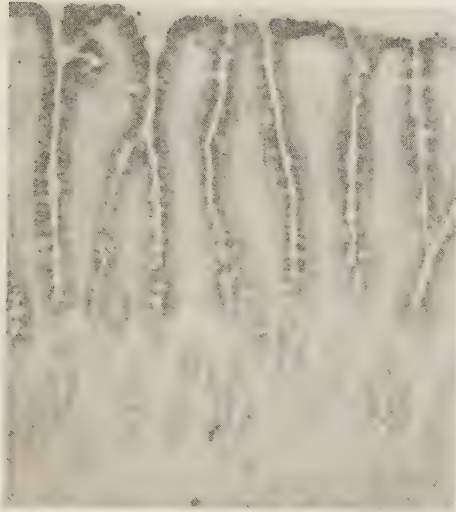


Abb. 9: Histochemische Darstellung der uE im Duodenum.
Vergr.: 90 x

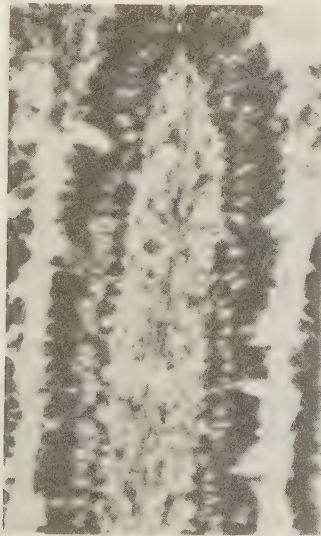


Abb. 10: Histochemische Darstellung der LDH im Duodenum.
Vergr.: 340 x

histochemischen Darstellung in erster Linie durch ihre regionalen Aktivitätsunterschiede im Epithel der Darmschleimhaut. Auch bei den Dehydrogenasen findet sich ein cranio-caudales Aktivitätsgefälle, das allerdings nicht so steil ausgeprägt ist wie bei einigen Hydrolasen. Weiterhin zeigt sich eine deutlich positive Reaktion in den Muskelzellen der Muskularis propria et mucosae, in den Ganglienzellen des Plexus submucosus und myentericus sowie in der Wand der größeren Blutgefäße.

V. Enzymhistochemische Befunde an experimentell erzeugten Darmtumoren

1. Hyperplastische Polypen und umschriebene Schleimhauthyperplasien:

Dem weitgehend regelhaften Aufbau der Schleimhaut entsprechend, zeigen die hyperplastischen Polypen ein mit der normalen Mukosa nahezu identisches Enzymverteilungsmuster (Abb. 11a). Die Hydrolasen und Dehydrogenasen weisen die gleiche intraepitheliale Lokalisation und Aktivität auf, wie sie in den benachbarten, unveränderten Anteilen der Mukosa und in der Darmschleimhaut unbehandelter Kontrolltiere beobachtet werden können. Nur die ATPase besitzt im Oberflächenepithel der hyperplastischen Polypen eine gegenüber der Norm gering gesteigerte Aktivität (Abb. 11b).

2. Adenomatöse Polypen und umschriebene adenomatöse Schleimhautveränderungen (Abb. 12a u. b):

Die Adenome des Dünndarms und des Dickdarms zeigen histologisch und histochemisch gleichartige Veränderungen, so daß die Befunde in beiden Darmabschnitten nicht getrennt vorgestellt werden müssen.

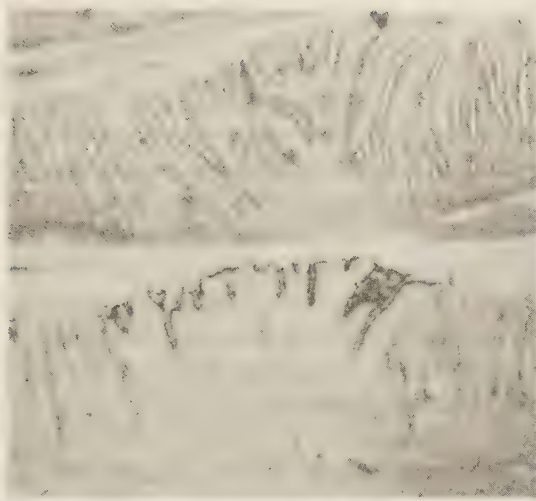


Abb. 11a u. b: Histochemische Darstellung der uE (a) und der ATPase (b) in einem hyperplastischen Polypen des Jejunum.
Vergr.: 35 x



Abb. 12a u. b: Histochemische Darstellung der a.Ph. Drüsenepithelien und subepitheliales Stroma bei einem adenomatösen Polypen (a) und Zottenepithelien des Duodenum (b).
Vergr.: 1400 x

In sämtlichen von uns histochemisch untersuchten Adenomen, die aus allen Regionen des Dünn- und des Dickdarms stammen, läßt sich im Bürstensaum der Epithelien sowie im Bereich der lateralen Zellmembran und der Golgi-Zone keine Aktivität an a.Ph. nachweisen. Dieser intraepitheliale Aktivitätsverlust fällt besonders im Duodenum auf, da hier in den tumorbenachbarten, erhaltenen Schleimhautbezirken bzw. in der Mukosa der Kontrolltiere das Oberflächenepithel eine sehr hohe Aktivität an a.Ph. aufweist. Im Gegensatz zu den Epithelien der normalen Darmschleimhaut färbt sich die Basis der Epithelzellen deutlich positiv an. Die Ablagerung des Reaktionsproduktes erfolgt hier wahrscheinlich im Bereich der basalen Zellmembraneinfaltungen. Die Bürstensaumaktivität der a.Ph endet nicht abrupt am Übergang der histologisch unveränderten Mukosa zu den Adenomen. In den dem Tumor unmittelbar benachbarten Zottenreihen ist die Bürstensaumaktivität der a.Ph. im Oberflächenepithel schwächer als in der normalen Mukosa bzw. sogar negativ. Dabei können intraepitheliale Lokalisation und Aktivitätshöhe der a.Ph. von Epithelzelle zu Epithelzelle differieren. Zwischen den Drüschenschläuchen der Adenome färben sich die Zottenkapillaren stark positiv an. Dies gilt auch für die Adenome des Duodenum, in dessen Mukosa normalerweise die Zottenkapillaren eine geringere Phosphataseaktivität aufweisen als in den übrigen Darmabschnitten.

Auch die Aktivität der s.Ph. ist in den Epithelzellen der Adenome wesentlich geringer als in der normalen Mukosa. Insbesondere die Aktivität der s.Ph. im Bereich der apikalen Zellanteile wird nahezu bzw. vollständig negativ. In der supranukleären Zone jedoch finden sich weiterhin feingranuläre Bleisulfidniederschläge. Insgesamt bietet sich ein unregelmäßiges

histochemisches Bild, da die Stärke und Topik des enzymatischen Reaktionsausfalles von Epithelzelle zu Epithelzelle variieren kann. Im Stroma zwischen den Drüenschläuchen hingegen findet sich eine hohe, granuläre Enzymaktivität in der Hauptsache in den Zellen des Makrophagensystems. Auch bei Darstellung der s.Ph. setzen die Veränderungen des intraepithelialen Enzymmusters nicht unmittelbar an der Grenze zwischen Mukosa und Adenomen ein, sondern sind schon in den unmittelbar benachbarten, lichtmikroskopisch noch regelhaft aufgebauten Schleimhautarealen zu beobachten.

Die ATPase zeigt in den adenomatösen Polypen zumeist keine intraepitheliale Aktivität. Regelmäßig positiv färben sich nur die Blutgefäße im Bereich des Polypenstieles. In einzelnen Polypen hingegen zeigen wenige Drüenschläuche eine positive Reaktion, wobei die apikale Region der Epithelzellen allerdings nur selten eine spezifische Reaktion zeigt. Reaktionsniederschläge finden sich in diesen Bezirken zumeist in der lateralen und basalen Zellmembran der Epithelzellen.

Die G-6-Pase, die 5-Nuc, die α -Glucosidase und LAP zeigen in den von uns untersuchten adenomatösen Polypen keine positive Reaktion.

Die uE kann in den Epithelzellen der adenomatösen Polypen nur in geringerer Aktivität als in der normalen Schleimhaut nachgewiesen werden. In den Drüsenepithelien finden sich supranukleär zumeist nur wenige Farbstoffgranula.

Sämtliche von uns untersuchten Dehydrogenasen zeigen in den Adenomen des Dünndarms und des Dickdarms weitgehend identische Verteilungsmuster, so daß die Befunde für die einzelnen Enzyme nicht getrennt

vorgestellt werden müssen. Insgesamt fällt die histochemisch nachweisbare Enzymaktivität in den Tumorzellen im Vergleich zu den Epithelien der normalen Mukosa deutlich ab. Dies gilt insbesondere für die Tumoren des Duodenum. In einzelnen Drüsen oder auch Drüsengruppen der Adenome kann die Aktivität der Dehydrogenasen ebenso stark bzw. manchmal sogar noch stärker sein als in der normalen Mukosa. Intraepithelial verringert sich in den Tumoren hauptsächlich die apikal gelegene Aktivität, während der unmittelbar supranukleäre, infra- und paranukleäre Reaktionsausfall weitgehend stabil bleibt. Ebenso wie bei den Hydrolasen können derartige Aktivitätsänderungen schon in den tumorbenachbarten, histologisch unauffälligen Schleimhautarealen beobachtet werden.

Da die einzelnen Präparate in Serienschnitten aufgearbeitet wurden, war es möglich in den histochemischen und in den HE-Präparaten umschriebene Tumorzirke direkt miteinander zu vergleichen. Dabei konnten histochemisch keine Unterschiede zwischen adenomatösen und herdförmig, carcinomatös entarteten Adenombezirken nachgewiesen werden. Bei den frühinvasiven Karzinomen sind jedoch charakteristische Reaktionen in der Umgebung der die Submukosa infiltrierenden Drüsenschläuche zu beobachten. Auch wenn nur ein einziger Drüsenschlauch die Muscularis mucosae lokal destruiert und in die Submukosa eindringt, kommt es an dieser Stelle, in Umgebung des Drüsenschlauches, zu einer ausgeprägten mesenchymalen Reaktion, die die Zeichen einer chronischen Entzündung trägt. In diesen Abschnitten kann die a.Ph. in sehr hoher Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13). Positiv reagieren in erster Linie die zahlreich vorhandenen Kapillaren.

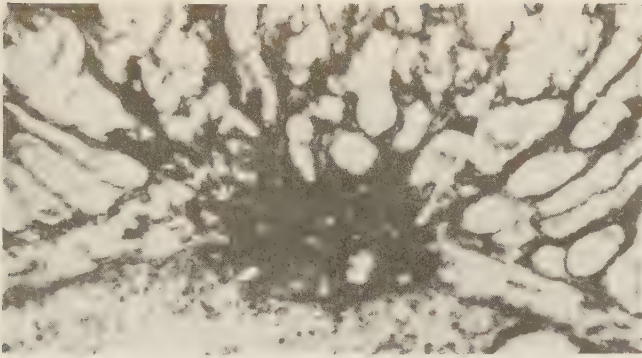


Abb. 13: Histochemische Darstellung der a.Ph. in einem adenomatösen Polypen mit beginnender karzinomatöser Entartung. In Umgebung eines die M. mucosae infiltrierenden Drüschlauches hohe Aktivität der a.Ph.
Vergr.: 340 x

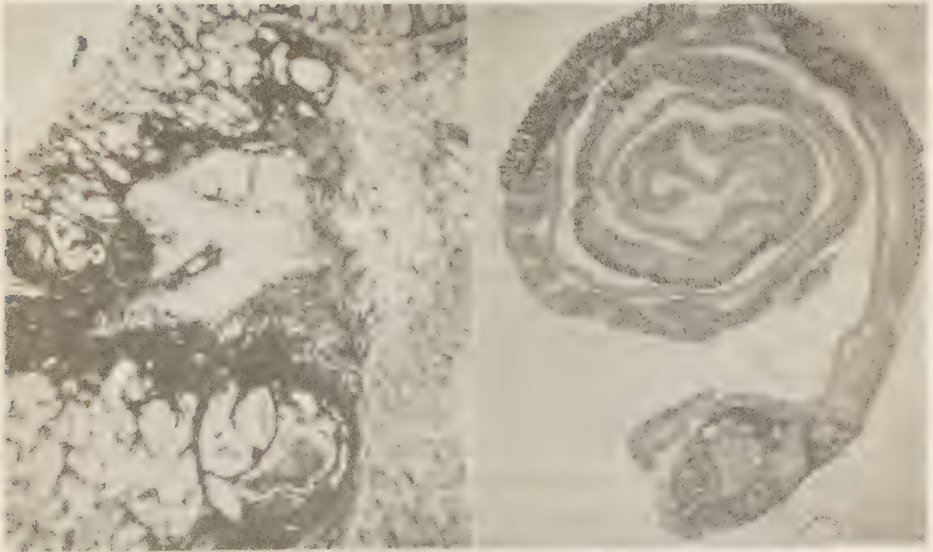


Abb. 14a u. b: Histochemische Darstellung der a.Ph. in der Randzone eines Adenokarzinoms (a) und am aufgerollten Dickdarmpräparat.
Vergr.: 90 x (a), (b) durch Bildvergrößerung.

Daneben findet sich auch eine hohe Aktivität der s.Ph. in den Makrophagen. Die einzelnen infiltrierenden Drüenschläuche werden geradezu von einem a.Ph.- und s.Ph.-positiven Gewebsbezirk umschnürt. Die oxidativen Enzyme zeigen hingegen in den invasiven Drüsen gegenüber den Drüenschläuchen in den adenomatösen Abschnitten keine charakteristische Änderung hinsichtlich Lokalisation und Intensität des Reaktionsausfalles.

3. Karzinome

a. Adenokarzinome:

Die a.Ph. läßt sich im Bürstensaum der Epithelien sowie in der lateralen Zellmembran und der Golgi-Zone in den Adenokarzinomen des Dünn- und des Dickdarms nicht nachweisen. Hingegen färbt sich die Basis der Epithelzellen im Gegensatz zu den Epithelien der normalen Schleimhaut deutlich positiv an. Zwischen Adenokarzinomen und lichtmikroskopisch unveränderter Mukosa findet sich keine scharfe Grenze. Die Epithelien der Dünndarmzotten in den histochemischen Präparaten am Übergang zu den Karzinomen weisen eine erheblich abgeschwachte oder auch negative Aktivität an a.Ph. auf. Im Tumorstroma zwischen den Drüenschläuchen färben sich Kapillaren an. Daneben finden sich im Stroma und auch in den Drüsenlumina reichlich Granulocyten, die eine positive Reaktion zeigen. Besonders auffallend ist die sehr hohe Aktivität der a.Ph. in den chronisch-entzündlich veränderten Randbezirken der Tumoren (Abb. 14a). Diese peritumoröse Reaktion ist auch bei sehr kleinen Karzinomen schon makroskopisch in den histochemischen Präparaten zu erkennen (Abb. 14b). Auch hier zeigt die a.Ph. insbesondere in den Kapillaren und den Granulocyten eine positive Reaktion.

Die s.Ph. läßt sich anhand feingranulärer Bleisulfidniederschläge in den supranukleären Anteilen der Tumorzellen lokalisieren. Dabei bietet sich ein unregelmäßiges, histochemisches Bild, da Intensität und auch Lokalisation des Reaktionsausfalles von Epithelzelle zu Epithelzelle innerhalb des gleichen Drüsenschlauches variieren können. Die im normalen Oberflächenepithel der proximalen Dünndarmschnitte angefärbten apikalen Zellanteile zeigen in den Epithelien der Karzinome zumeist nur noch eine schwache Reaktion. Zwischen den Drüsenschläuchen weisen die zahlreich vorhandenen Zellen des Makrophagensystems eine hohe Aktivität auf. Ebenso wie die a.Ph. läßt sich die s.Ph. in der peritumorösen Randzone in hoher Aktivität nachweisen, die auch hier überwiegend in den Makrophagen lokalisiert ist. Zwischen Adenokarzinom und lichtmikroskopisch unveränderter Mukosa findet sich keine scharfe Grenze (Abb. 15).

Die Aktivität der ATPase variiert in den Drüsenepithelien der einzelnen Adenokarzinome in erheblichem Ausmaß und zwar unabhängig vom Sitz der Tumoren. In einigen Adenokarzinomen ist die ATPase völlig negativ und nur wenige größere und kleinere Blutgefäße in den Randbezirken der Tumoren zeigen eine positive Reaktion. In anderen Tumoren hingegen weisen die Drüsenschläuche herdförmig oder diffus im gesamten Tumor z.T. sehr hohe Aktivitäten auf. Dabei zeigen die Tumorzellen teilweise eine wesentlich höhere Aktivität als die Oberflächenepithelien im gleichen Darmsegment der Kontrolltiere. Das gilt auch für Tumoren des Dickdarms. Die intrazelluläre Lokalisation und Intensität ist variabel und kann sich von Epithelzelle zu Epithelzelle innerhalb eines Drüsenschlauches ändern. Eine positive Reaktion findet sich im Bereich der apikalen, basalen und lateralen Zellmembran (Abb. 16).

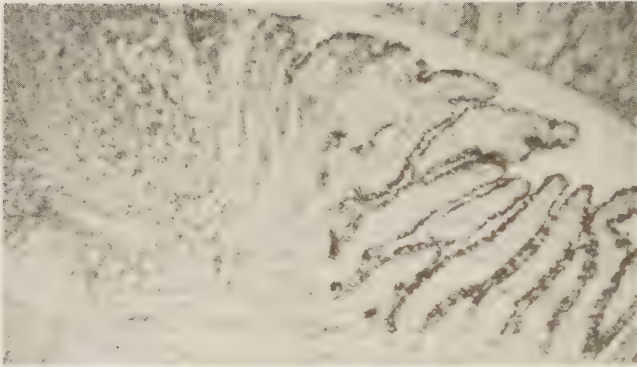


Abb. 15: Histochemische Darstellung der s.Ph. an der Grenze zwischen einem Adenokarzinom (links) und der normalen Duodenalschleimhaut (rechts).
Vergr.: 90 x

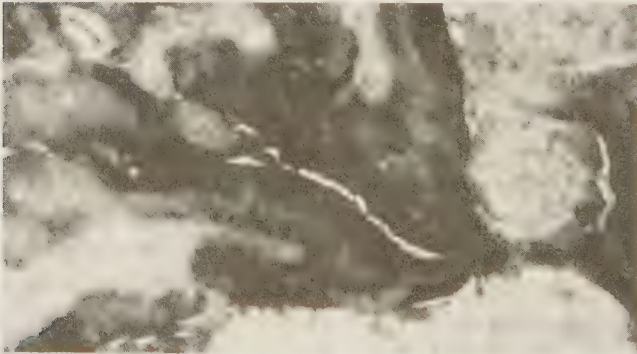


Abb. 16: Histochemische Darstellung der ATPase in den Drüsen eines Adenokarzinoms.
Vergr.: 560 x

Die G-6-Pase und 5-Nuc sind in den meisten Adenokarzinomen völlig negativ. Nur in wenigen Tumoren findet sich basal in den Epithelien und im Stroma zwischen den Drüsenschläuchen eine geringe Aktivität.

Die α -Glucosidase ist in allen Tumoren völlig negativ.

Die uE zeigt in einzelnen Tumorzellen im Vergleich zu den Epithelien in der normalen Mukosa nur noch eine minimale Aktivität. In den meisten Tumorzellen jedoch läßt sich keinerlei Aktivität mehr nachweisen. Die Farbstoffniederschläge finden sich in Form weniger, kleiner Granula, die zumeist unmittelbar dem oberen Kernpol aufsitzen. Weiterhin färben sich einzelne in den Drüsenlumina und im Tumorrandbereich liegende Zellen deutlich positiv an.

Mit der von uns angewandten histochemischen Methode läßt sich in den Tumorzellen keine Aktivität der LAP nachweisen. Nur in der Umgebung der Karzinome finden sich einzelne oder gruppenförmig beieinander liegende Zellen mit positiver Reaktion. Beim Vergleich mit den in Schnittserien parallel angefertigten HE-Präparaten können in diesen Arealen keine Tumorverbände mehr nachgewiesen werden. Es finden sich hier die Zeichen einer chronischen Entzündung mit zahlreichen Makrophagen.

Die Dehydrogenasen zeigen in den Tumoren insgesamt eine niedrigere Aktivität als in der normalen Mukosa. In den Tumoren selbst findet sich eine unregelmäßige, fleckförmige Aktivität (Abb. 17). Auch innerhalb eines einzelnen Drüsenschlauches kann die Enzymaktivität von Epithelzelle zu Epithelzelle differieren.

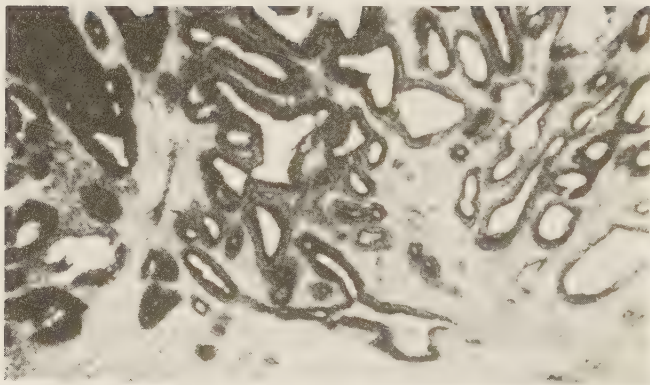


Abb. 17: Histochemische Darstellung der LDH in
einem Adenokarzinom. Vergr.: 141 x



Abb. 18a u. b: Histochemische Darstellung der LDH
im Drüsenepithel eines Adenokarzinoms
ohne Schleimbildung (a) und mit
Schleimbildung (b).
Vergr.: 1400 x

Im Vergleich zu den normalen Oberflächen- und Kryptenepithelien vermindert sich in den Tumorzellen hauptsächlich die Intensität des apikalen Reaktionsausfalles, während die infra- und paranukleäre Aktivität weitgehend erhalten bleibt (Abb. 18a). Die Aktivität der einzelnen Dehydrogenasen wechselt häufig von Tumor zu Tumor. Eine gegenüber der normalen Schleimhaut zwar abgeschwächte, jedoch noch deutliche Aktivität in nahezu sämtlichen von uns untersuchten Adenokarzinomen zeigen die LDH, MDH, SDH, DPN und HBDH. Die MAO reagiert in den einzelnen Tumoren in unterschiedlichem Ausmaß. In einigen Tumoren findet sich eine deutliche Aktivität, wobei die Stärke des Reaktionsausfalles in einigen Drüsengruppen an diejenige in der normalen Mukosa heranreichen kann. In anderen Tumoren hingegen läßt sich keine Aktivität der MAO nachweisen. Überwiegend sehr niedrige Aktivitäten in den Tumoren zeigen die G-6-PD, IDH, GDH und GPDH. Herdförmig in einzelnen Drüsen oder Drüsengruppen weisen aber auch diese oxidativen Enzyme z.T. deutliche Aktivitäten auf.

Schleimbildende Adenokarzinome:

Die schleimbildenden Adenokarzinome zeigen weitgehend gleichartige histochemische Enzymmuster wie die nichtschleimbildenden Adenokarzinome. In den Tumorzellen werden die histochemisch nachweisbaren Enzymaktivitäten durch intraplasmatische Schleimansammlungen in die Zellperipherie verdrängt (Abb. 18b). Außerdem ist die Aktivität der meisten nachgewiesenen hydrolytischen und oxidativen Fermente niedriger als in den Tumorzellen nicht schleimbildender Adenokarzinome.

b. Solide Karzinome:

Die schleimbildenden und die nicht-schleimbildenden, soliden Karzinome weisen weitgehend gleichartige Enzymmuster auf. Die Ergebnisse können deshalb gemeinsam vorgestellt werden.

Die a.Ph. reagiert im Stroma stark positiv. Die Hauptaktivität findet sich wahrscheinlich in den stellenweise dicht bei dicht liegenden, unregelmäßig angeordneten Kapillaren, deren Zahl gegenüber den adenomatösen Tumoren vermehrt scheint (Abb. 19). Auch die s.Ph. zeigt in den soliden Tumoren eine hohe Aktivität. Ein Großteil dieser Aktivität ist wahrscheinlich in den reichlich vorhandenen Makrophagen lokalisiert. Jedoch können bei den soliden Karzinomen in den histochemischen Präparaten Tumorzellen und Makrophagen zumeist nicht sicher differenziert werden. Aus diesem Grund ist die Entscheidung darüber oft nicht möglich, ob Aktivitätsänderungen auf Vorgänge innerhalb der Stromazellen oder der Tumorzellen zurückzuführen sind. Gleichartige Probleme ergeben sich auch bei Beurteilung der histochemischen Reaktion der ATPase in soliden Karzinomen. Zumeist findet sich in den soliden Karzinomen eine gleichmäßig niedrige Aktivität mit stärkerem Reaktionsausfall in der Wand einzelner Blutgefäße. Fleckförmig läßt sich jedoch insbesondere in den Tumorrandbezirken eine hohe intrazelluläre Aktivität nachweisen, wobei nicht sicher entschieden werden kann, ob diese hohe Aktivität in den Stroma- oder in den Tumorzellen zu lokalisieren ist. Mit den von uns angewandten Methoden zeigen die G-6-Pase, 5-Nuc., α-Glucosidase, LAP und u. in den soliden Karzinomen keine positive Reaktion.

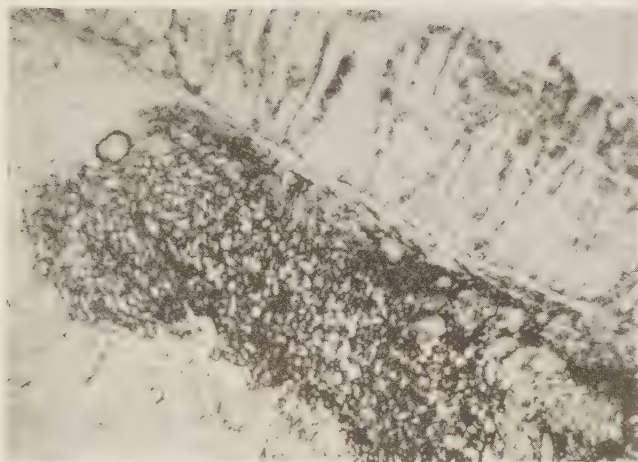


Abb. 19: Histochemische Darstellung der a.Ph. in
einem soliden Karzinom, das zungenartig
die Submukosa infiltriert.

Vergr.: 90 x

Dem niedrigen Differenzierungsgrad der soliden Karzinome entsprechend ist die Aktivität der von uns untersuchten Dehydrogenasen niedriger als in den Tumorzellen der adenomatösen Karzinome. Gleichwohl können einzelne Tumorzellen oder Zellgruppen in den soliden Tumoren sehr hohe Dehydrogenasen-Aktivitäten aufweisen (Abb. 20), während benachbarte Tumorareale nur einen minimalen enzymatischen Reaktionsausfall erkennen lassen. In den Siegelringzellen konfluieren die Formazangranula in Umgebung der Schleimhautvakuolen (Abb. 21a u. b).

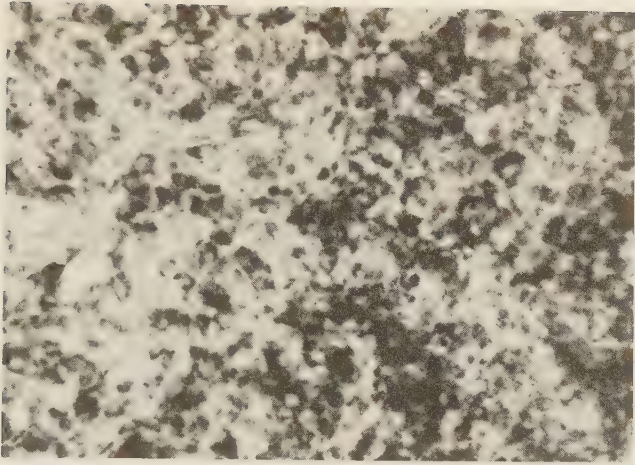


Abb. 20: Histochemische Darstellung in einem
soliden, schleimbildenden Karzinom.
Vergr.: 340 x

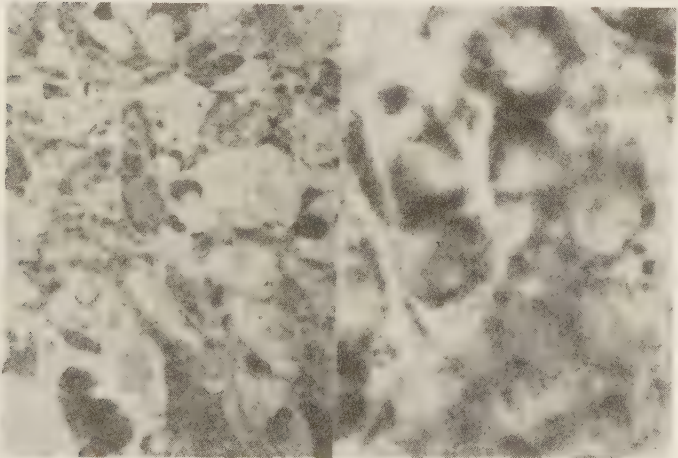


Abb. 21a u. b: a. Semidünnschnitt eines soliden,
schleimbildenden Karzinoms mit Siegel-
ringzellen. Methylenblau, Vergr.: 340 x
b. Histochemische Darstellung der LDH
in Siegelringzellen. Vergr.: 1400 x

D. Diskussion

Vergleicht man die histochemisch nachweisbare Aktivität der a.Ph. in den adenomatösen Polypen verschiedener Darmabschnitte miteinander, so zeigt sich, daß in allen Polypen die Reaktion im Bereich des Bürstensaumes der Drüenschläuche völlig negativ ist. Dies fällt insbesondere im proximalen Dünndarm auf, da hier im Oberflächenepithel die Reaktion der a.Ph. bei Kontrolltieren besonders intensiv ist. Die Aktivität der a.Ph. nimmt in den Epithelien am Übergang zu den Tumoren allmählich ab. Gleichartige Befunde ergeben sich auch bei den Adenokarzinomen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von VÖLLNAGEL u. Mitarb. (1969) und SCHAUER und Mitarb. (1969a) überein, die ebenfalls DMH-induzierte Darmtumoren untersuchten. Wenn auch die Funktionen der a.Ph. in ihren Einzelheiten nicht sicher bekannt sind, so weisen doch zahlreiche Untersuchungen darauf hin, daß in der normalen Darmschleimhaut dieses Enzym bei Resorptionsvorgängen eine wesentliche Rolle spielt. Dies konnte für Lipide (KLEIN, 1967; HUGON, 1968), Glucose (VERZAR, 1952a u. b) und Aminosäuren (SAUNDERS, 1966; HUGON, 1968) nachgewiesen werden. AMON (1969) ist der Meinung, daß die a.Ph. für den energiefreien, das heißt sauerstoffunabhängigen Membrantransport von Bedeutung ist. Darüberhinaus ist in der normalen Darmschleimhaut, besonders in den proximalen Darmabschnitten, die Aktivität der a.Ph. ein Gradmesser für die Höhe der Zelldifferenzierung und Zellfunktion. Umgekehrt verlaufen in den Tumorzellen die abnehmende Differenzierung und die Änderung des Funktionszustandes, die durch die Aggressivität der Tumorzellen, den Grad der Nekrobiose, Vaskularisierung der Tumoren und andere Faktoren modifiziert werden, parallel zum Abfall der Aktivität der a.Ph. in den Tumorzellen (ARNOLD, 1950; PFLEIDERER, 1968).

Im basalen Anteil der Tumorzellen läßt sich die a.Ph. in deutlicher Aktivität nachweisen, sowohl bei adenomatösen Polypen als auch bei Adenokarzinomen. Wahrscheinlich ist hier die Aktivität im Bereich der basalen Einfaltungen der Zellmembran lokalisiert. Ob sich auch bei soliden Tumoren die Zellmembran positiv anfärbt, kann lichtmikroskopisch nicht sicher entschieden werden, da im gesamten Stroma zwischen den Tumorzellverbänden eine hohe Aktivität an a.Ph. vorhanden ist, ohne auffallende Aktivitätsdominanz in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen, wie sie zum Beispiel in den adenomatösen Polypen und Adenokarzinomen nachgewiesen werden kann.

Neben dem beschriebenen Reaktionsausfall der a.Ph. in den Drüsenepithelien findet sich im Tumorstroma eine starke Aktivität der a.Ph. Sie kann hier in Granulocyten, Kapillaren und Fibroblasten nachgewiesen werden. Bei zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren nimmt die Aktivität der a.Ph. im Tumorstroma deutlich zu und zeigt im Interstitium der soliden Karzinome ihre intensivste Reaktion. Auffallend ist auch die hohe Aktivität der a.Ph. in den entzündlich veränderten Tumorrandbezirken. Histologisch finden sich hier die Zeichen der chronisch-granulierenden Entzündung mit proliferierendem Bindegewebe und Kapillaren sowie Makrophagen. Dieser entzündlich-proliferierende Prozeß ist als Abwehrreaktion auf den Tumorreiz aufzufassen (MURATA, 1966; MORI, 1968). Die entzündliche Reaktion und die damit verknüpfte Induktion der a.Ph. beginnt in dem Augenblick, in dem die ersten Tumorzellen die Muskularis mucosae durchbrechen und in die inneren Abschnitte der Submucosa eindringen. Im Widerspruch zu den Ergebnissen von MARCHESI und BARNETT (1964) findet sich bei uns in den Kapillärwänden im Tumorbereich ein stark positiver Ausfall der a.Ph. Dies kann als Äquivalent für eine intensivere Nährstoffversorgung des Tumorgewebes gegenüber dem gesunden Gewebe

gedeutet werden. Die a.Ph. der Kapillaren zeigt eine hohe Aktivität in Geweben mit hoher Stoffwechselaktivität und hoher transmembraner Transportrate (AMINOWA, 1964; HÜTTNER, 1967; NIKOLOFF, 1971). PEARSON und DEFFENDI (1955 a u. b) beobachteten, daß primär phosphatasenegative Kapillaren des Omentum majus in Umgebung von Tumormetastasen phosphatasepositiv wurden. Wie bei Untersuchungen am Omentum majus festgestellt wurde (EDER, 1959), nimmt die Permeabilität von Kapillaren im Bereich von chronisch entzündlichen Prozessen zu. Gleichzeitig kommt es zu einer Induktion der a.Ph. in den Kapillaranwandungen.

Die Aktivität der s.Ph. fällt in den Tumorepithelien im Vergleich zur normalen Schleimhaut ab. Histochemisch können feingranuläre Bleisulfidniederschläge perinukleär nachgewiesen werden. Dabei variiert die Aktivität der s.Ph. in den einzelnen Tumorzellen deutlich. Dies gilt sowohl für die adenomatösen Polypen als auch die einzelnen Karzinomformen. Wie die a.Ph. zeigt auch die s.Ph. gleitende Aktivitätsübergänge zwischen gesunder Mucosa und dem Tumorgewebe. Schon in den Epithelzellen lichtmikroskopisch noch regelrecht aufgebauter Mukosaanteile finden sich lokale Aktivitätsänderungen der s.Ph. Wie bei der a.Ph. ist auch der Abfall der Aktivität der s.Ph. sehr wahrscheinlich auf einen Reifungsdefekt und die Entdifferenzierung der Epithelien zurückzuführen (PADYKULA, 1961; CZERNOBILSKY, 1968).

Eine hohe Aktivität an s.Ph. findet sich im Stroma zwischen den Drüsenschläuchen von adenomatösen Polypen und Adenokarzinomen in der Hauptsache in den Zellen des Makrophagensystems. Bei soliden Karzinomen hingegen ist zumeist nicht sicher zu differenzieren, ob diese hohe Aktivität in den Tumorzellen oder in den Makrophagen lokalisiert ist.

Bei den Adenokarzinomen findet sich auch eine hohe Enzymaktivität in den Makrophagen der peritumorösen Randzone. Die Induktion der s.Ph. wird insbesondere durch phagocytotische Vorgänge stimuliert. So konnte gezeigt werden, daß nach Röntgenbestrahlung von Tumorzellen nicht nur die Zahl der Makrophagen im Tumorgewebe anstieg, sondern auch der absolute Gehalt an s.Ph. deutlich zunahm (SHIMOSATO, 1967). Wie andere Autoren nachweisen, ist dabei der Anstieg der s.Ph. während des Phagocytosevorganges unabhängig von der aufzunehmenden Substanz (EDER, 1959).

Die Leucinaminopeptidase läßt sich nur im Randbereich der Adenokarzinome darstellen, während sich in den adenomatösen Polypen und in den soliden Karzinomen keine positive Reaktion fand. Bei Adenokarzinomen zeigte sich keine spezifische Reaktion in den Tumorzellen (FISCHER, 1959), sondern nur eine peritumoröse Reaktion in einzeln oder gruppenförmig beieinander liegenden Zellen. Wie beim Vergleich mit HE-Präparaten festgestellt werden konnte, handelt es sich bei diesen LAP-positiven Zellen wahrscheinlich um Makrophagen, die am Rande des Tumorgewebes, im Bezirk der chronisch-granulierenden Entzündung, liegen (HESS, 1960). Auch BURSTONE (1956) und BRAUN-FALCO (1957) haben von einer Reaktion der LAP im Stroma bösartiger Tumoren und im peritumoröse, entzündlich alteriertem Gewebe berichtet. Sie kamen zu dem Schluß, daß eine Abhängigkeit zwischen der Stärke der LAP-Reaktion im Tumorstroma und dem Malignitätsgrad des Tumors besteht.

Dies können wir auf Grund unserer Ergebnisse nicht bestätigen. Auch folgende Aussage läßt sich anhand unserer Untersuchungen nicht bestätigen: So betrachten die Autoren SYLVÉN u. Mitarb. (1957 u. 1964a) die Aktivitätserhöhung der LAP in der Tumorumgebung als Folge einer Enzymausschleußung aus der Tumorzelle in das Stroma. Diese Enzymausschleußung soll der Wegbereiter für die Makrophagen sein.

die zu einer fermentativen Aufbereitung der zu infiltrierenden Umgebung führen sollen. Dagegen spricht, daß bei der von uns angewandten histochemischen Methode die randständigen und invasiven Tumorzellen keine Aktivität an LAP aufweisen. Wahrscheinlich ist, daß die LAP-Aktivität des Stromas von Zellelementen des Makrophagensystems herührt und nicht von Tumorzellen gebildet wird (FISCHER, 1959). Es kann im Rahmen dieser Arbeit nicht entschieden werden, ob die Aktivität der LAP physiologischer Bestandteil der Zellen des Makrophagensystems ist (MONIS, 1958) oder ob die Aktivität der LAP im peritumorösen Gewebe erst durch die Tumorzellen induziert wird (SCHMIDT-MATHIESEN, 1958; HAMPERL, 1966 u. 1967; RATH, 1969).

Die von uns untersuchten Dehydrogenasen zeigen eine nur unbedeutende Aktivität im Stroma der Tumoren im Vergleich zu der relativ hohen Aktivität in der Tumorzelle selbst. Insgesamt ist die Dehydrogenasen-Aktivität in den Tumorzellen jedoch niedriger als in den Epithelien der normalen Mukosa. Insbesondere die deutlich ausgeprägte Aktivität im supranukleären Zytoplasma ist in den Tumoren deutlich abgeschwächt. Diese Aktivitäts- und Lokalisationsänderung der Dehydrogenasen deutet auf Veränderungen im intermediären Stoffwechsel hin.

Im allgemeinen zeigen hochdifferenzierte Karzinome eine stärkere Dehydrogenasen-Aktivität als undifferenzierte Karzinome (SUGIMURA, 1964; SCHAUER, 1969a). Dies weist auf eine Korrelation zwischen Dehydrogenasen-Aktivität und dem Grad der Zelldifferenzierung bzw. der Ausreifung der Zellfunktion hin. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von NIEMI (1961) bei menschlichen Magentumoren und vor allem den Untersuchungen von PFLEIDERER (1968) beim Karzinom des Endometriums des Corpus uteri beim Menschen. Beide Autoren konnten mit abnehmender Differenzierung der Tumoren eine Steigerung der SDH-Aktivität nachweisen.

Eine deutliche Aktivität sowohl bei adenomatösen Polypen als auch bei den verschiedenen Karzinomformen zeigen die LDH, MDH, SDH, DPN und HBDH, eine schwächere Aktivität die G-6-PD, IDH und GDH. Auffallend sind die fleckförmigen Aktivitätsschwankungen innerhalb der Tumoren, die manchmal auch innerhalb ein und desselben Drüsenschlauches auftreten. MONIS u. Mitarb. (1959) führten diese Inkonstanz von Aktivitätshöhe und Lokalisation der Dehydrogenasen in Tumoren darauf zurück, daß in den einzelnen Tumorzellen verschiedene Wege des intermediären Stoffwechsels dominieren können. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich Aktivität und Lokalisation der Dehydrogenasen zwischen Tumorzellen im Randbereich der Tumoren und z.B. Tumorzellen im Tumorzentrum festgestellt werden. Damit ergeben sich keine Hinweise auf eine eventuell erhöhte Stoffwechselaktivität der Tumorzellen im Randbereich von Tumoren wie dies z.B. von PFLEIDERER (1968) angenommen und von EDER (1961) als Aktivierung der am oxydativen Abbau beteiligten Enzymsysteme in den invasiven Tumorabschnitten gedeutet wurde. Der Abfall der SDH-Aktivität in den Tumoren weist auf eine Depression des Zitronensäurezyklus hin. Vergleichbare Veränderungen wurden auch in regenerierenden, nicht tumorös umgewandelten Geweben nachgewiesen, z.B. der Leber (PEARSON, 1959), im Magen-Darm-Trakt (WATTENBERG, 1959; FOLEY, 1960). Dieser Abfall der SDH-Aktivität deutet auf Änderungen im intermediären Stoffwechsel hin, die sowohl gutartigen als auch bösartigen, proliferierenden Prozessen gemeinsam sind und stellt damit kein spezifisches Merkmal für Tumoren dar (WATTENBERG, 1959; RUDOLPH, 1961).

Die G-6-PD zeigt eine sehr geringe Aktivität in den Darmkarzinomen. Sie ist eines der Schlüsselenzyme im Pentosephosphatzyklus, in dem u.a. Ribose für die Nukleinsäuresynthese gebildet wird. Da im Tumorgewebe die Nukleinsäuresynthese erheblich gesteigert ist, müßte man einen

gesteigerten Pentosephosphatzyklus und damit verbunden eine erhöhte Aktivität an G-6-PD erwarten. Aber anscheinend ist die Tumorzelle nur in geringem Maße in der Lage, über den Pentosephosphatzyklus Ribose zu bilden. RUDOLPH (1961) kommt bei seinen Untersuchungen von Leberkarzinomen zu dem Schluß, daß die für die Nukleinsäuresynthese vermehrt benötigte Ribose vorwiegend anaerob entsteht und zwar aus Fructose-6-phosphat und Glyzerinaldehyd. Eine weitere Erklärung für die erniedrigte G-6-PD-Aktivität im Karzinomgewebe sieht RUDOLPH (1961) in einer fehlenden mitochondrialen Haftfläche für die spezifischen Dehydrogenasen. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, daß andere Dehydrogenasen wie die SDH und die NAD-Diaphorase, die ebenfalls überwiegend an die Mitochondrienstruktur gebunden sind, eine deutliche Aktivität aufweisen.

E. Zusammenfassung

N,N-Dimethylhydrazin erzeugte nach subcutaner Injektion von 21 mg pro kg Körpergewicht, einmal wöchentlich verabreicht, in einem Zeitraum von 180 - 200 Tagen Darmtumoren.

Diese Darmtumoren wurden enzymhistochemisch durch folgende Enzyme untersucht: Alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Adenosintriphosphatase, Glucose-6-Phosphatase, 5-Nuclotidase, α -Glucosidase, Leucinaminopeptidase, unspezifische Esterase, Monoaminoxidase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase, Succinodehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase, NADH-Diaphorase.

Die alkalische Phosphatase zeigte bei adenomatösen Polypen und adenomatösen Schleimhautveränderungen Aktivitätsverluste im Oberflächenepithel, im Gegensatz dazu findet sich in den Kapillaren im Tumorstroma eine hohe Aktivität. Auch bei der sauren Phosphatase ist die Aktivität in den Epithelzellen geringer, im Stroma zwischen den DrüsenSchläuchen ließ sich eine hohe granuläre Enzymaktivität nachweisen. Bei beiden Enzymen lassen Karzinome eine hohe Aktivität in der peritumorösen Randzone erkennen.

Die ATPase stellte sich bei adenomatösen Polypen und Karzinomen in den Blutgefäßen positiv dar. Im Karzinom finden sich teils ATPase-negative, teils ATPase-positive Epithelzellen. Glucose-6-Phosphatase, 5-Nuclotidase, Glucosidase zeigten keine Aktivität.

Leucinaminopeptidase läßt keine Aktivität in der Tumorzelle erkennen. Nur in der Umgebung des Karzinoms finden sich einzelne Zellen mit positiver Reaktion.

Bei den Dehydrogenasen stellt sich überwiegend eine niedrigere Aktivität dar, stellenweise aber auch eine höhere Aktivität als im normalen Epithel.

F. Literaturverzeichnis

1. ALLBACH, G.: Histochemische Untersuchungen über das Verteilungsmuster und circadiane Verhalten von Darmschleimhautenzymen erwachsener männlicher Ratten. Med. Diss. Mainz, 1972
2. AMINOWA, G.: Endothel und Muskulatur der Arterien, Kapillaren und Venen in funktioneller Beleuchtung. Arch. Anat. 2, (1964) Russisch
3. AMON, H.: Morphologische Kriterien von Resorptions- und Exkretionsvorgängen. Med. Welt 20 (N.F.), 1371-1378 (1969)
4. ARNOLD, W. and St. OECH: Histochemische Phosphataseuntersuchungen bei malignen Tumoren. Z. Krebsforsch. 56, 543-555 (1960)
5. BARKA, T. and P.J. ANDERSON: Histochemical methods for acid phosphatase using Hexazonium Pararosanilin as coupler. J. Histochem.Cytochem. 10, 741-753 (1962)
6. BARKA, T.: Fat absorption and acid phosphatase activity in testinal epithelium of mice. J.Am.Med.Ass. 183, 761-764 (1963)
7. BARKA, T.: Electron histochemical localisation of acid phosphatase activity in the small intestine of mouse. J.Histochem.Cytochem. 12, 229-238 (1964)
8. BERENBLUM, J., N. HARAN and A. ROSIN: The carcinogenic action in the mouse of 20-Methyl-cholanthrene by rectal administration Am.J.Path. 32, 579-589 (1956)
9. BRAUN-FALCO, O.: Histochemical demonstration of aminopeptidase in normal and pathological skin. J.Histochem. 5, 94-95 (1957)
10. BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie 3. Aufl. Berlin 1973

11. BURSTONE, M.S.: Histochemical demonstration of proteolytic activity in human neoplasms. J.Nat.Cancer.Inst. 16, 1149-1162 (1956)
12. BURSTONE, M.S.: Histochemical demonstration of acid phosphatase with Naphthol-AS-phosphates. J.Nat.Cancer.Inst. 21, 523-539 (1958)
13. BURSTONE, M.S.: Enzyme Histochemistry and its Application in the Study of Neoplasms. Acad.Press, New York 1962
14. CHIQUOINE, A.D.: Further studies on the histochemistry of glucose-6-phosphatase. J.Histochem.Cytochem. 3, 471-478 (1955)
15. CLARK, S.L.: The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. J.Biophys.Biochem.Cytol. 5, 41-50 (1959)
16. CRANE, R.K.: A concept of the digestive-absorptive surface of the small intestine. In: Handbook of physiology. Hrg.v. C.V.Code. Bd. V/6, S.2535-2542, Washington, 1968
17. CZERNOBILSKY, B. and K.-C. TSOU: Adenocarcinoma, adenomas and polyps of the colon. Cancer 21, 165-177 (1968)
18. DANIELLI, J.F.: The calcium phosphate precipitation method for alkaline phosphatase. General Cytochemical Methods 1, 423-443 (1958)
19. DAWSON, J. and J. PRYSE-DAVIES: The distribution of certain enzyme systems in the normal human gastro-intestinal tract. Gastroenterology 44, 745-760 (1963)
20. DEIMLING, O.H.v.: Die Darstellung phosphatfreier Enzyme mittels Schwermetall-Simultan-Methoden. Histochemie 4, 48-55 (1964)
21. DIXON, M. and E.C. WEBB:

"Enzymes" 2nd Ed London (1964)

22. DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, F. MATZKIES und S. IVANKOVIC:
Selektive Erzeugung von Darmkrebs
bei Ratten durch 1,2 Dimethylhydrazin.
Naturwissenschaften 54, 285-286 (1967a)
23. DRUCKREY, H.: Chemische Konstitution und carcinogene
Wirkung alkylierender Substanzen.
Zweite Konferenz über aktuelle Pro-
bleme der Tabakforschung.
Freiburg 1967 b, S.42-60
24. DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMAHL:
Organotrope carcinogene Wirkungen bei
65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen
an BD-Ratten.
Z.Krebsforsch. 69, 103-201 (1967c)
25. DRUCKREY, H.: Krebserzeugung durch chemische
Substanzen.
Fortschritte d.Krebsforschung. Bericht
über die 10. wissenschaftliche Tagung
des Deutschen Zentrallausschusses für
Krebsbekämpfung u. Krebsforschung e.V.,
Berlin 1968.
Herausgegeben von Prof.Dr.C.G.Schmidt
u. Priv.-Doz.Dr.O.Weiter.
Schattauer Verlag, Stuttgart 1969
26. DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, F. MATZKIES und S. IVANKOVIC:
Carcinogene Wirkung von 1,2 Diaethyl-
hydrazin an Ratten.
Naturwissenschaften 53, 557-558 (1966)
27. DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC, H.C. SCHMIDT,
B.T. SO und C. THOMAS: Carcinogene Wirkung von Azoäthan
und Azoxyäthan an Ratten.
Z.Krebsforsch. 67, 31-45 (1965)
28. DUVE, C.de: The lysosome.
Scient.Amer. 208, 64-72 (1963)
29. DUVE, C.de and R. WATTIAUX: Functions of lysosomes.
Ann. Rev.Physiol. 28, 435-492 (1966)
30. EDER, M.: Der histochemische Nachweis des
Fermentes Monaminoxidase.
Beitr.path.Anat. 117, 341-396 (1957)
31. EDER, M.: Der histochemische Nachweis und die
Bedeutung des Fermentes Monamin-
oxidase.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 41, 161-165 (1958)

32. EDER, M.: Histochemische Fermentnachweise.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 42, 374-394
(1959)
33. EDER, M. und H. WRBA: Fermenthistochemische Untersuchungen
zur Biologie von Aszitestumoren und
ihrer Umwandlung in solide Geschwülste.
Z.Krebsforsch. 64, 353-365 (1961)
34. EVANS, J.T., G. LUTMAN und A. MITTELMAN: The induction
of multiple large bowel neoplasms
in mice.
J.Med. 3, 212-215 (1972)
35. FISCHER, R.: Über den histochemischen Nachweis
der Aminopeptidase im Krebsgewebe.
Z.Krebsforsch. 63, 18-27 (1959)
36. FOLEY, W.A. and L.W. WATTENBERG: A histochemical study
of regenerating large bowel epithelium.
Arch.Path. 70, 675-684 (1960)
37. FORSTNER, F.F., S.H. SABESIN and K.J. ISSELBACHER: Rat
intestinal microvillous membranes.
Purification and biochemical
characterization.
Biochem.J. 160, 381-390 (1968)
38. FREIMANN, D.G. und N. KAPLAN: Studies on the histo-
chemical differentiation of enzymes
hydrolyzingadenosine triphosphate
J.Histochem.Cytochem. 8, 159-170 (1960)
39. FRIC, P. and Z. LOJDA: Enzymes of the human jejunal mucosa.
Acta gatro-enterol. Belg. 27, 526-530
(1964)
40. GINSBERG, V. und H.G.HERS: On the conversion of fructose
to glucose by guinea pig intestine.
Biochem.biophys.acta 38, 427-434 (1960)
41. GLENNER, G.G., H.J. BURTNER and G.W. BROWN jr.: The histo-
chemical demonstration of monoamine
oxidase by terazolium salts.
J.Histochem.Cytochem. 5, 591-600 (1957)
42. GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer
Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoff-
methode.
Histochemie 1, 48-96 (1958)

43. GOMORI, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 42, 23-26 (1939)
44. GOMORI, G.: An improved histochemical technic for acid phosphatase. Stain Technol. 25, 81-85 (1950)
45. HAMPERL, H.: Über das infiltrierende Tumorwachstum. Untersuchungen am Carcinom und am sogenannten Carcinoma in situ. VirchowsArch.path.Anat. 340, 185-205 (1966)
46. HAMPERL, H.: Early invasive growth as seen in uterine cancer and the role of the basal membrane. In mechanisms of invasion in cancer. Ed.by P.Denoix. UICC Monograph Series, Vol. 6, 17-25 Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag (1967)
47. HARDONK, M.J.: 5'-Nucleotidase. I.Distribution of 5'-nucleotidase of rat and mouse. Histochemie 12, 1-17 (1968a)
48. HARDONK, M.J. und J. KOUNDTAAL: 5'-Nucleotidase. II. The significance of 5'-nucleotidase in the metabolism of nucleotides by histochemical and biochemical methods. Histochemie 12, 18-22 (1968b)
49. HARRISON, D.D. und H.L. WEBSTER: Proximal to distal variations in enzymes of the rat intestine. Biochim.Biophys. acta 244, 432-436 (1971)
50. HAWKS, A., E. FARBER und F.W. MAGEE: Equilibrium centrifugation studies of colon DNA from mice treated with the carcinogen 1,2 dimethylhydrazine. Chem.-Biol.Interactions 4, 144-148 (1971/72).
51. HERS, H.C. und G.de DUVE: Le système hexose-phosphatasique. II. Répartition de l'activité Glucose-6-phosphatasique dans les tissus. Bull.Soc.Chim.Biol. 32, 20-29 (1950)

52. HERZOG, V. und H. AMON: Vergleichende histochemische Untersuchungen über den Phosphatase-Gehalt der Kapillaren.
Verh.d.Anat.Ges. 61, 513-518 (1966)
53. HESS, R.: Localisation of a cathepsin-like and aminopeptidase activity in various solid tumor transplants.
Cancer Research 20, 940-943 (1960)
54. HOHN, P. und A. SCHÄFER: Verteilungsmuster von Enzym-aktivitäten im Darm der Ratte in verschiedenen Lebensabschnitten.
Actuell.gerontol. 2,6, 331-343 (1972)
55. HOLMES, R.S. and C.J. MASTERS: The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases
Biochim.biophys.Acta 132, 379-399 (1967)
56. HOROVA, A. und E.von HAAM: Experimental carcinoma of the colon.
Cancer Research 18, 764-767 (1958)
57. HSU, L. and A.L. TAPPEL: Lysosomal enzymes of rat intestinal mucosa.
J.Cell Biol. 23, 233-240 (1964)
58. HUGON, J. and M. BOURGERS: Submicroscopic localization of the alkaline phosphatase activity in the duodenum of the rat.
Exper.Cell.Res. 45, 698-702 (1966 a)
59. HUGON, J. and BOURGERS, M.: Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the absorbing cells of the duodenum of mouse.
J.Histochem.Cytochem. 14, 629-640 (1966 b)
60. HUGON, J. and M. BOURGERS: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase activities in the absorbing cells in the duodenum of rodents.
Histochemie 12, 42-46 (1968)
61. HÜTTNER, J., T. KERÉNYI, B. VERESS, A. TÓTH, E. KONYÁR und H. JELLINEK: Über die Verteilung der alkalischen Phosphatase der Gefäßadventitia von Ratten bei experimenteller Hypertonie.
Acta histochem. 26, 21-27 (1967)

62. IWAI, N.: Histochemical studies of smal and large bowels. Part 1: Some enzymatic activities of normal human and laboratory animals. Jap.Arch.Intern.Med. 16, 227-241 (1969)
63. JERVIS, H.R.: Enzymes in the mucosa of the small intestine of the rat, the guinea pig and the rabbit. J.Histochem.Cytochem. 11, 692-699 (1963)
64. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. 7. Aufl. Stuttgart 1970
65. KOBAYASHI, A.: Biochemical studies on cycasin. Part I. Purification and properties of cycad β -glucosidase. Agr.Biol.Chemistry 26, 203-207 (1962)
66. KLEIN, U.E., H.C. DRUDE und H.Th. HANSEN: Untersuchungen über Muster und Verteilung von Enzymen in der Schleimhaut des menschlichen Gastrointestinaltraktes. II. Histochemische und ergänzende Isoenzymuntersuchungen. Klin.Wschr. 45, 95-101 (1967)
67. LANE, N.J. and A.B. NOVIKOFF: Effekts of arginine deprivation, ultraviolet radiation and x-radiation on cultured KB cells. A cytochemical and ultrastructural study. J.Cell Biol. 27, 603-620 (1965)
68. LAQUEUR, G.L., O. MICKELSEN, M.G. WHITING and L.T. KURLAND: Carcinogenic properties of nuts from Cycas circinalis L. indigenous to Guam. J.nat.Cancer Inst. 31, 919-951 (1963)
69. LAQUEUR, G.L.: The induction of intestinal neoplasms in rats with the Glycoside Cycasin and its Aglycone. Virchows Arch.path.Anat. 340, 151-163 (1965)
70. LAQUEUR, G.L., E.G. McDANIEL and H. MATSUMOTO: Tumor induction in gremfree rats with methylazoxymethanol (MAM) and synthetic MAM acetate. J.Nat.Cancer Inst. 39, 355-361 (1967)

71. LORENZ, E. and H.L. STEWART: Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-Dibenzanthracene and 20-Methylcholanthrene.
J.Nat.Cancer Inst. 1, 17-40 (1940)
72. LORENZ, E. and H.L. STEWART: Tumors of the alimentary tract induced in mice by feeding olive-oil emulsions containing Hydrocarbons.
J.Nat.Cancer Inst. 7, 227-238 (1947)
73. LOJDA, Z.: Some remarks concerning the histochemical detection of disaccharidases and glycosidases.
Histochemie 5, 339-360 (1965)
74. LOJDA, Z., P. FRIC, J. JODL and V. CHMELIK: Cytochemistry of the human jejunal mucosa in the norm and malabsorption syndrome.
Curr.Top.Path. 52, 1-63 (1970)
75. MAGEE, P.N. and J.M. BARNES: The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Brit.J.Cancer 10, 114-122 (1956)
76. MAGEE, P.N. and E. FARBER: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem.J. 83, 114-124 (1962a)
77. MAGEE, P.N. and T. HULTIN: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of proteins of rats liver slices by dimethylnitrosamine in vitro.
Biochem.J. 83, 106-114 (1962b)
78. MARCHESI, V.T. and R.J. BARNETT: The localization of nucleosidphosphatase activity in different types of small bloodvessels.
J.Ultrastruct.Res. 10, 103 (1964)
79. MATSUMOTO, H. and F.M. STRONG: The occurrence of methylazoxymethanol in Cycas circinalis L.
Arch.Biochem. 101, 299-310 (1963)
80. MATSUMOTO, H., T. NAGAHAMA and H.O. LARSON: Studies on Methylazoxymethanol, the Aglycone of Cycasin: A synthesis of Methylazoxymethyl acetate.
Biochem.J. 95, 13c (1965)

81. MATSUMOTO, H. and H.H. HIGA: Studies on Methylazoxy-methanol, the Aglycone of Cycasin: Methylation of nucleic acids in vitro. Biochem.J. 98, 20c-22c (1966)
82. Mc.COLL, J. and J.A. NISSIM: Mechanism of intestinal absorption in man. Natur 207, 949-951 (1965)
83. MEIER-RUGE, W. und K.E. KARONSSOS: Die Enzymhistochemie als funktioneller Parameter in der mikroskopischen Anatomie. Im Selbstverlag des Path.Inst. der Universitätsklinik Basel 1970
84. MEIER-RUGE, W.: Inkubation media for routine laboratory work on enzyme histochemistry. Beitr.Path. 144, 409-431 (1971)
85. MIKA, H.: Histochemische Untersuchungen über das Verteilungsmuster und circadiane Verhalten hydrolytischer Enzyme der Darmschleimhaut erwachsener männlicher Ratten. Med.Diss. Mainz 1972
86. MILLER, D. and R.K. CRANE: The digestive funktion of the epithelium of the small intestine. II. Localisation of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of intestinal epithelial cells. Biochim.Biophys. acta 52, 293-298 (1961)
87. MONIS, B., M.M. NACHLAS and A.M. SELIGMAN: Study of leucine aminopeptidase in neoplastic and inflammatory tissues with a new histochemical method. Cancer 12, 601-608 (1958)
88. MONIS, E., M.M. NACHLAS and A.M. SELIGMAN: Histochemical study of 3 dehydrogenase system in human tumors. Cancer 12, 1238-1247 (1959)
89. MORI, K., S. ICHII and Y. SHIGETA: Furthers studies on the gastric lesions of rats by oral administration of Methylcholanthrene, with a case of colonic adenocarcinoma. Gann 46, 631-634 (1955)

90. MORI, M., Y. MORIMOTO, Y. YOSHIMURA and H. KAWAMURA:
Enzymatic histochemical demonstration
of basalcell carcinoma in the oral
cavity.
Oral Surgery 25, 746-755 (1968)
91. MORRIS, H.P., B.P. WAGNER, F.E. RAY, H.L. STEWART and
K. SNELL: Comparative carcinogenic
effects of N,N'-2,7-Fluorenylenebisa-
cetamide by intraperitoneal and oral
routes of administration to rats,
with particular reference to gastric
carcinoma.
J.Nath.Cancer Inst. 34, 157-174 (1965)
92. MURATA, I., H. KAWASHIMA and M. MORI: Histochemical study
on alkaline phosphatase activity in
human neoplasms.
Gann 57, 513-525 (1966)
93. MYERS, D.K.: "Carboxyl Ester Cleavage". In "The
Enzymes" Vol. 4.p. 475. Eds.Boyer,
P.D., lardy, H., and Myrback,
K.Academie Press, New York 1960
94. NACHLAS, M., D. CRAWFORD and A. SELIGMAN: The histo-
chemical demonstration of leucine
aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem. 5, 264-276 (1957)
95. NACHLAS, M., D. WALKER and A. SELIGMAN: A histochemical
method for the demonstration of
diaphosphopyridine nucleotide diaphorase
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4, 29-38
(1958)
96. NIEMI, M., M. SIURALA and T.K.L. LARMI: Histochemistry of
three dehydrogenase systems in
cancerous and noncancerous human
stomachs with spezial reference to
intestinal metaplasie.
Acta Pathol.et Mikrobiol.Scandinav.53,
139-146 (1961)
97. NIKOLOFF, Sp.D.: Histochemische Untersuchungen über
alkalische Phosphataseaktivität der
organinneren Blutkapillaren in den
großen Speicheldrüsen.
Acta histochemica suppl. XI, 159-163
(1971)

98. ÖCKERMANN, P.A.: Glucose-6-phosphatase im human jejunal mucosa properties demonstrating the specific character of enzyme activity. Biochem.Biophys. acta 105, 22-33 (1965a)
99. ÖCKERMANN, P.A. and H. LUNDBERG: Conversion of fructose to glucose by human jejunum. Absence to galactose-to-glucose conversion. Biochem.Biophys. acta 105, 34-42 (1965b)
100. OSSWALD, H. und F.W. KRÜGER: Die cancerogene Wirkung von 1,2 DMH beim Goldhamster. Arzneimittelforschung 19, 1891-1892 (1969)
101. PADYKULA, H.A., F.W. STRAUSS, A.J. LADMAN and F.H. GARDNER: Amorphologic and histochemical analysis of the human jejunal epithelium in non tropical sprue. Gastroenterology 40, 735-765 (1961)
102. PATTERSON, E.K., S.-H. HSIAO and A. KEPPEL: Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. Distinction between leucine aminopeptidase and enzyme that hydrolyze L-Leucyl-β-Naphthylamide. J.biol.Chem. 238, 3611-3620 (1963)
103. PEARSE, A.G.E. and E.O. RIECKEN: Histology and Cytochemistry of the cells of the small intestine in relation to absorption. Brit.Med.Bull. 23, 217-222 (1967)
104. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied. 3. Aufl.London 1968, Bd. I
105. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and applied. 3. Aufl. London 1972, Bd. II
106. PEARSON, B. and V. DEFFENDI: Histochemical studies of succinic dehydrogenase by means of tetrazolium in rat liver tumors induced by p-Dimethylaminoazobenzene. Canc.Res. 15, 593-596 (1955)
107. PEARSON, B. and V. DEFFENDI: A comparison of histochemical properties of tumors with the tissues of their origin. Texas Rep.Biol. a Med. 13, 667-677 (1955)
108. PEARSON, B., F.B.S. GROSE and R. GREEN: Histochemical changes in liver succine dehydrogenase during rapid growth following partial hepatectomy. Am.J.Path.35, 139-151 (1959)

109. PFLEIDERER, A.: Enzymhistochemische Untersuchungen am Ca des Corpus uteri.
Fortschr.Med. 86, 195-200 (1968)
110. RACK, J.F., N. KAUFMANN and F.A. SIMEONE: The effect of 20-methylcholanthrene applied directly to the colon in mice.
Canc.Res. 15, 722-725 (1955)
111. RAGGI, F., D.S. KRONFELD and N. KLEIBER: Glucose-6-phosphatase activity in various sheep tissues.
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 105, 485-486 (1960)
112. RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1969, 5. Aufl.
113. RATH, F., U. BONK, J. COUTELLE, R. COUTELLE, D. FELIETTI und F. TRAUB: Vergleichende histologische und elektronenmikroskopische sowie histo- und biochemische Untersuchungen zum invasiven Tumorstadium. III. Ferment-histochemische Untersuchungen.
Arch. Geschwulstforsch. 34, 116-127 (1969)
114. RIBELIN, W.E. and G.J. LEVINSKAS: Diverticulitis and neoplasia of the small intestine of rats fed 2-(p-Dimethylaminostyryl)-1-methylquinolinium methyl sulfate.
Toxicol.Appl.Pharmacol. 7, 619-626 (1965)
115. RIECKEN, E.O., R.H. DOWLING, C.C. BOOTH and A.G.E. PEARSE: Histochemical changes in the rat small intestine associated with enhanced absorption high bulk feeding.
Enzymol.Biol.Clin. 5, 231-244 (1965)
116. ROSENBERG, J. and L. ROSENBERG: Localization and characterization of adenosine triphosphatase in guinea pig intestinal epithelium.
Comp.Biochem.Physiol. 24, 975-985 (1968)
117. RUDOLPH, G.: Enzymhistochemische Untersuchungen zum Pentosephosphatzyklus in normalen Geweben und in Carcinomen.
Verh.dtsch.Ges.Path. 45, 113-119 (1961)
118. RUDOLPH, G. und H. KLEIN: Histochemische Darstellung und Verteilung der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in normalen Rattenorganen.
Histochemie 4, 238-251 (1964)

119. RUTENBERG, A.M., J.A. GOLDBERG, S.H. RUTENBERG and R.T. LANG: The histochemical demonstration of -D-glucosidase in mammalian tissues. J.Histochem.Cytochem. 8, 268-272 (1960)
120. SAUNDERS, S.J. and K.J. ISSELBACHER: Intestinal absorption of amino acids. Gasterology 50, 586-595 (1966)
121. SCARPELLI, D.G. and A.G.E. PEARSE: Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localisation of enzymes. J.Histochem.Cytochem 6, 369-376 (1958)
122. SCHABAD, I.M.: Wjesztn, rjentgjenoi, i. radioi, 5, 165 (1927)
123. SCHÄFER, A. und P. HÖHN: Vergleichende histochemische Untersuchungen über das Verteilungsmuster von oxydativen und hydrolytischen Enzymen in der Darmschleimhaut neugeborener und adulter Ratten. Verh.dtsch.Ges.Path. 55, 438-444 (1972)
124. SCHÄFER, A.: Elektronenmikroskopische und enzym-histochemische Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Darmschleimhaut der Ratte unter orthologischen und experimentell-pathologischen Bedingungen. Med.Habil.Schr. Mainz 1972
125. SCHAUER, A., Th. VÖLLNAGEL und F. WILDANGER: Morphologische und histochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung der Darmschleimhaut der Ratten durch 1,2-Dimethylhydrazin. Verh.dtsch.Ges.Path. 53, 234-236 (1969a)
126. SCHAUER, A., Th. VOLLNAGEL und F. WILDANGER: Cancerisierung des Rattendarmes durch 1,2-Dimethylhydrazin. Z.ges.exp.Med. 149, 277-278 (1969b)
127. SCHREIBER, D., A. LAGEMAN und M. GEYER: Erzeugung von Dünndarmkarzinomen bei Kaninchen mit Methylnitrosoharnstoff. Zbl.allg.Path. 115, 40-47 (1972a)

128. SCHREIBER, D., R. WARZOK, P. SCHOLTZE, J. SCHNEIDER,
A. LAGEMAN und H. BATKA: Das Spektrum
extraneuraler Tumoren bei Ratten nach
Applikation von N-methyl-N-nitrosoharn-
stoff.
Zbl.allg.Path. 115, 48-61 (1972b)
129. SCHMIDT-MATTHIESEN, H.: Das Kollumkarzinom und sein Binde-
gewebe. Morphologie, Histochemie und
Systematik als Grundlage klinischer
Bewertung.
Z.Geburtsh. 151, 155 (1958)
130. SCHOENTAL, R.: Induction of intestinal tumors by
N-ethyl-N-nitrosourethane.
Nature 208, 300 (1965)
131. SCHOENTAL, R. and J.P.M. BENSTED: Tumors of the intestine
induced in rats by intraperitoneal
injections of N-methyl- and N-ethyl-N-
nitrosourethanes.
Britsch.Journal of cancer 22, 316-323
(1968)
132. SHIMOSATO, Y. and K. WATANABE: Enzymmorphological obser-
vation on irradiated tumor, with a
particular reference to acid hydrolase
activity. I. Light microscopic study.
Gann 58, 541-550 (1967)
133. SHNITKA, T.K.: Enzymatic histochemistry of gastro-
intestinal mucous membrane.
Fed.Proc. 19, 897-903 (1960)
134. SMITH, D.W.E.: Mutagenicity of cycasin aglycone(methyl-
azoxymethanol), a naturally occurring
carcinogen.
Science 152, 1273-1274 (1966)
135. SPATZ, M., E.G. McDANIEL and G.L. LAQUEUR: Cycasin excretion
in conventional and gremfree rats.
Proc.Soc.exp.Biol. 121, 417-422 (1966)
136. SPATZ, M. and G. LAQUEUR: Transplacental induction of
tumors in Sprague Dawley rats with
crude cycad material.
J.Nat.Cancer Inst. 38, 233-239 (1967a)
137. SPATZ, M., W.J. DOUGHERTY and D.W.E. SMITH: Peratogene
effects of methylazoxymethanol.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 124, 476-478
(1967b)

138. SPJUT, H.J. and M.W. NOALL: Experimental induction of tumors the large bowel of rats.
Cancer 28, 29-37 (1971)
139. STEWART, H.L. and E. LORENZ: Histopathology of induced precancerous lesions of the small intestine of mice.
J.Nat.Cancer Inst. 7, 239-268 (1947)
140. STEWART, H.L., K.C. SNELL and H.P. MORRIS: The combined effect of 3 methylcholanthrene and N,N'-2,7-fluorenyllenebisacetamide on the induction of cancer of the glandular stomach of the rat.
J.Nat. Cancer Inst. 34, 157-174 (1965)
141. SUGIMURA, M., T. MATSUMURA, Y. HAYASHI, Y. MURAOKA and M. MORI: Histochemical studies on dehydrogenase activity of spontaneous breast cancer in C₃H mouse.
Gann 55, 125-128 (1964)
142. SYLVÉN, B. and H. MALMGREN: The histological distribution of proteinase and peptidase activity in solid tumor transplants.
Acta radiol.suppl. 154, 1-124 (1957)
143. SYLVÉN, B. and J. BOIS-SVENSSON: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction. IV. Chemical and histochemical characterization of the intracellular and stromal LNA reactions in solid tumor transplants.
Histochemie 4, 135-149 (1964a)
144. SYLVÉN, B. and O. SNELLMAN: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction. III. On the different LNA-splitting enzymes from spleen.
Histochemie 3, 484-486 (1964b)
145. SYLVÉN, B. and O. SNELLMAN: Studies on the histochemical "leucine aminopeptidase" reaction. V. Cathepsin B as a potential effector of LNA hydrolysis.
Histochemie 12, 240-243 (1968)
146. TEAS, H.J. and J.G. DYSON: Mutation in Drosophila by methylazoxymethanol, the aglykon of cycasin.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 125, 988-990 (1967)

147. TOTH, B.: Tumorigenesis studies with 1,2 Dimethylhydrazine dihydrochloride, hydrazine sulfate and isonicotinic acid in golden hamsters.
Canc. Res. 32, 804-807 (1972)
148. VERZÁR, F. und E. SAILER: Glucose-Resorption und alkalische Phosphatase des Dünndarms nach Adrenalectomie bei mit NaCl behandelten Tieren.
Helv.physiol.acta 10, 247-258 (1952a)
149. VERZÁR, F., E. SAILER und R. RICHTERICH: Einfluß der Nebennierenrinde auf die alkalische Phosphatase der Dünndarmschleimhaut.
Helv.physiol.acta 10, 231-246 (1952b)
150. VÖLLNAGEL, Th., F. WILDANGER und A. SCHAUER: Enzymhistochemische Untersuchungen am Rattendarm während der Cancerisierung durch 1,2 DMH.
Z.ges.exp.Med. 151, 208-213 (1969)
151. WACHSTEIN, M. and E. MEISEL: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic ph.
Amer.J.Clin.Path. 27, 13-23 (1957)
152. WALPOLE, A.L., M.H.C. WILLIAMS and D.C. ROBERTS: The carcinogenic actions of 4-aminodiphenyl and 3,2'dimethyl-4-aminodiphenyl.
Brit.J.Indust.Med.9, 255-263 (1952)
153. WATTENBERG, L.W.: A histochemical study of succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase in proliferative lesions of the large intestine.
Canc. Res. 19, 1118-1123 (1959)
154. WIEBECKE, B., U. LÖHR, J. GIMMY und M. EDER: Erzeugung von Darmtumoren bei Mäusen durch 1,2 DMH.
Z.ges.exp.Med. 149, 277-278 (1969)
155. WILLIAMS, H.E., P.L. JOHNSON, L.F. FENSTER, L. LASTER and J.A. FIELD: Intestinal glucose-6-phosphatase in control subjects and relatives of a patient with glycogen storage disease.
Metabolism 12, 235-241 (1963)
156. WILLIAMS, J.N. and G.L. LAQUEUR: Response of liver nucleic acids and lipids in rats fed cycas circinalis L. Endosperm or Cycasin.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 118, 1-4 (1965)

157. WILLIAMS, R.M. and F. BECK: Demonstration of alkaline phosphatase in the lysosomes of neonate rat ileum. Histochem.J. 1, 531-538 (1969)
158. WILSON, R.H., F. deED and A.J. COX: The toxicity and carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene. Canc.Res. 1, 595-608 (1941)
159. WINNE, D.: Der Mechanismus der enteralen Wasser- und Natriumchloridresorption. Med. Welt 19, (N.F.) 2774-2781 (1968)
160. WITTIG, G., G.P. WILDNER und D. ZIEBARTH: Der Einfluß der Ingesta auf die Cancerisierung des Rattendarms durch Dimethylhydrazin. Arch.Geschwulstforschung 37, 105-115 (1971)
161. WITTKOP, J.A., R.A. PROUGH and D.J. REED: Oxidative demethylation of N-methylhydrazines by rat liver microsomes. Arch.Biochem.Biophys. 134, 308-315 (1969)
162. YAMADA, S., M. ITO and T. NAGAYO: Histochemical and autoradiographical studies on intestinal tumors of rat induced by oral administration of N,N'-2,7-Fluorenylenebisacetamide. Gann 62, 471-478 (1971)

Herrn Prof. Dr. med. A. Schäfer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung.

Besonders danke ich Herrn Dr. med. P. Höhn für die Einführung in die Methoden der Histochemie.

Lebenslauf

Am 1. November 1949 wurde ich, Rolf Leopold Dietzel, als zweites Kind des Arztes für Allgemeinmedizin Dr. med. Leopold Dietzel und der Ehefrau Lilo, geb. Hanisch, in Alsenborn geboren.

Im Anschluß an eine vierjährige Volksschulzeit besuchte ich von 1960 - 1968 das Staatliche Altsprachliche Gymnasium in Kaiserslautern, wo ich auch die Reifeprüfung ablegte.

Seit dem Wintersemester 1968/69 studierte ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zuerst zwei Semester Physik, danach Medizin. Im Sommersemester 1970 absolvierte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Wintersemester 1971/72 die Ärztliche Vorprüfung. Nach dem Wintersemester 1974/75 beabsichtige ich das Medizinische Staatsexamen abzulegen.

